

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



Identificación de nuevos mecanismos  
patogénicos de la inflamación renal por  
inhibidores de calcineurina

Carlos Ocaña Salceda

Tesis Doctoral

Madrid, 2015



**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**CARLOS OCAÑA SALCEDA  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MÁSTER EN DIANAS TERAPÉUTICAS**

**DIRECTORES:**

**Dr. Adrián M. Ramos y Dr. Alberto Ortiz Arduán**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SANITARIAS -FUNDACIÓN  
JIMÉNEZ DÍAZ, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**







Don Adrián M. Ramos, investigador Miguel Servet II en el Instituto de Investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez Díaz, y Don Alberto Ortiz Arduán, profesor titular de Medicina en la Universidad Autónoma de Madrid.

CERTIFICAN

Que Don Carlos Ocaña Salceda, Licenciado en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Nuevos mecanismos patogénicos en la nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 5 de mayo de 2015:

Los Directores de Tesis:

Dr. Adrián M. Ramos Cortassa

Dr. Alberto Ortiz Arduán



*A mis padres.*

*Porque mis éxitos se los debo a ellos y mis fracasos son míos.*

***"Kein Schlachtplan überlebt die erste Feindberührung."***

-Helmuth Karl Bernhard von Moltke-



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer al Doctor Adrián Ramos el haberme dado la oportunidad de demostrar mi capacidad para trabajar duro y ser científicamente competente y al doctor Alberto Ortíz el haberme aceptado en su grupo y haber valorado mis opiniones. Nada de esto habría sido posible sin ellos. Agradezco también al doctor Jesús Egido el haberme acogido en su laboratorio como a uno más.

Cristian, has sido mi compañero durante los últimos tres años y pico. Eres mi Compañero (mayúscula justificada: compañero de los de poli de pelis corruptos) pero siento también el orgullo de considerarte mi amigo. Esta tesis no habría sido materialmente posible sin Adrián ni Alberto pero sin ti no lo habría sido posible espiritualmente. Nos hermana un lazo forjado en la lucha contra la adversidad. "Nos vemos en la playa." te escribí una vez. Ya estoy aquí y tú casi también. Es posible.

Belén. ¿Qué más puedo decirte que no te haya escrito ya antes? Eres mi amiga y me has visto en lo mejor y lo peor. Sin ti, como sin Cristian, esta tesis no habría llegado a ser, todo el trabajo se habría quedado por el camino. Te quiero, Picatoste, y si la amistad de alguien me ha mantenido a este lado de la cordura ha sido la tuya.

Alfonso: amigo mío, eres un pieza y si tuviese que trabajar contigo probablemente te intentaría asfixiar pero me alegro infinitamente de haberte conocido y de que me hayas alegrado los días. Gracias por inyectar alegría en la rutina del labo.

Cernest, de un saco de neurosis a otro, gracias por estar ahí y reírte con mis comentarios sarcásticos, gracias por las discusiones sobre música y cine, gracias, amigo.

Charlie, Conchi, Alberto, Avo, los veteranos, gracias por acogerme y hacerme sentir parte del grupo. Gracias por estar ahí para discutir las cosas, para trabajar hasta tarde, para reír, para compartir los buenos ratos que hacen tanta falta en medio de este trabajo tan jodido. Gracias por recordarme que también somos personas.

Gracias también a lo, Ainhoa y Carlota, las chicas de Carmen, y a Elena por su buen humor, dentro y fuera del labo. Gracias a Maca, Sandra, Jose y Raúl, del grupo de Marta, y a Jonay por ser compañeros como los que más. Gracias Su, por toda tu ayuda; el trabajo de los técnicos no está suficientemente reconocido. Gracias Patri, por estar ahí para ayudar y por las conversaciones.

No quiero olvidarme de Sergio, porque tenemos muchas cosas que nos separan pero no podía haber pedido un mejor compañero. Quique, te deseo todo lo mejor y que consigas lo que te propones.

Gracias a Ana y Loli, por su apoyo en innumerables ocasiones. Gracias a los jefes: a Marta, a Carmen, a José Luis y a Luis, por sus consejos, por su actitud y por poner todo lo posible de su parte para que el trabajo salga adelante.

Gracias, en general, a toda la gente del laboratorio y de la Fundación Jiménez Díaz que ha hecho posible con su trabajo que llegue hasta aquí.

Y por último., gracias a todos mis amigos de fuera: a Rubén, Alan, Luis y Rober, porque ya llevan más de la mitad de mi vida aguantándome. Gracias a Lourdes, porque es mucho mejor de lo que quiere ver; a Cuky, porque también lleva ahí más de diez años en lo mejor y lo peor; a Ana y a Jorge, por todas las partidas. También gracias a Patch y a Diego, a Reme y a Sergio, por estar ahí. Gracias a Be, a Jona y a Tato por las cenas de los miércoles. Gracias a todos, con toda mi sinceridad. Si a un hombre se le puede medir por sus amigos, entonces soy más grande que los Beatles.

## Resumen

La inflamación es un importante factor patogénico de la enfermedad renal y como tal constituye un potencial objetivo terapéutico. En este trabajo de tesis nos propusimos caracterizar los mecanismos moleculares de la nefrotoxicidad de los inhibidores de calcineurina. Los inhibidores de calcineurina son unos fármacos inmunosupresores ampliamente utilizados en diversos contextos clínicos cuya toxicidad limitante de dosis es renal. En concreto hipotetizamos que la inducción de una respuesta inflamatoria puede contribuir a inducir o amplificar el daño renal. Nos propusimos identificar mediadores moleculares y mecanismos de la inflamación renal producida por los inhibidores de calcineurina para desarrollar nuevas aproximaciones terapéuticas.

En células cultivadas hemos observado que tanto ciclosporina como tacrolimus inducen la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias y moléculas de adhesión en células tubulares renales y células endoteliales. El efecto proinflamatorio de los inhibidores de calcineurina está mediado por el receptor de inmunidad innata TLR4 y el reclutamiento de las vías de señalización intracelular  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ , JNK y JAK/STAT. El adaptador MyD88 es necesario para la señalización de TLR4. La represión de la expresión de calcineurina mediante silenciamiento génico limitó la señalización por la ruta de JNK y por la rama adaptada por TRIF en la señalización por TLR4.

Los efectos proinflamatorios tempranos de los inhibidores de calcineurina son reproducibles *in vivo*, en ratones a los que se les administró ciclosporina. El tratamiento de estos animales con un inhibidor farmacológico de TLR4 redujo la respuesta inflamatoria y el daño tubular.

En conclusión, los inhibidores de calcineurina desencadenan una respuesta inflamatoria en células renales y activación endotelial a través del reclutamiento de diversas rutas de señalización dependientes del receptor de inmunidad innata TLR4. TLR4 es una posible diana terapéutica para prevenir los efectos nefrotóxicos de estos fármacos.





## Summary

Inflammation is an important pathogenic factor in kidney disease and constitutes a potential therapeutic target. In this thesis work, we focused on the characterization of the molecular mechanisms of nephrotoxicity induced by calcineurin inhibitors. Calcineurin inhibitors are immunosuppressant drugs whose dose limiting factor is nephrotoxicity. We hypothesized that induction of an inflammatory response may contribute to promote or amplify nephrotoxic kidney injury. We aimed to identify molecular mediators and characterize the molecular mechanisms of kidney inflammation in response to calcineurin inhibitors in order to develop novel therapeutic strategies.

In cultured cells we have observed that both cyclosporine and tacrolimus induce the expression of genes encoding proinflammatory cytokines and adhesion molecules in kidney tubular and endothelial cells. The proinflammatory effect of calcineurin inhibitors requires the activation of the innate immunity receptor TLR4 and TLR4-dependent signalling pathways including  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ , JNK and JAK/STAT. Silencing of the MyD88 adaptor protein via specific siRNA confirms the requirement for MyD88. Silencing calcineurin partially inhibited the inflammatory response and signaling through JNK and the TRIF branch of the TLR4 pathway.

We confirmed the early proinflammatory effects of calcineurin inhibitors in vivo in kidneys of mice treated with cyclosporine. A pharmacological inhibitor of the TLR4 reduced the magnitude of the inflammatory response and tubular damage.

In conclusion, calcineurin inhibitors induce inflammation and endothelial activation through the engagement of several innate immunity receptor TLR4-dependent signaling pathways. TLR4 is a possible therapeutic target to prevent anticalcineurin nephrotoxicity.



## Índice



|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN</b>   | <b>11</b> |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | <b>21</b> |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | <b>25</b> |
| <b>1.1. Papel de la inflamación en la patología renal</b>  | <b>27</b> |
| 1.1. El Riñón. Generalidades   | 27        |
| 1.1.2. Fisiopatología de la Inflamación renal  | 28        |
| <b>1. 2. Mediadores Inflamatorios en la fisiopatología renal</b>   | <b>29</b> |
| 1.2.1. Factor de transcripción NF-κB   | 29        |
| 1.2.2. Señalización por la ruta NF-κB  | 30        |
| 1.2.3. Citoquinas y Quimioquinas   | 32        |
| 1.2.4. Vías de transducción de Proteínas Quinasas  | 33        |
| 1.2.4.1. Vías de señalización de Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos                                      | 33        |
| 1.2.4.2. Vías de señalización de las Janus Quinasas  | 34        |
| 1.3. Respuesta Inmune Innata   | 36        |
| <b>1.4. Otras respuestas adaptativas dependientes de estrés</b>  | <b>38</b> |
| <b>1.5. Inhibidores de calcineurina</b>  | <b>39</b> |
| 1.5.1. Bases farmacológicas del uso de inhibidores de calcineurina como inmunosupresores en el<br>alotransplante | 39        |
| 1.5.2. Patología renal aguda y crónica asociada al uso de inhibidores de calcineurina                            | 40        |
| 1.5.3. Participación de calcineurina en los efectos nefrotóxicos de los CNIs                                     | 42        |
| <b>1.6. Modelos experimentales de nefrotoxicidad por CNIs</b>  | <b>43</b> |
| <b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>  | <b>49</b> |
| <b>Hipótesis</b>   | <b>51</b> |
| <b>Objetivos</b>   | <b>53</b> |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>   | <b>55</b> |
| <b>3.1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i></b>   | <b>57</b> |
| 3.1.1    Líneas Celulares  | 57        |
| 3.1.2    Estímulos e Inhibidores utilizados  | 57        |
| <b>3.2.    ESTUDIOS <i>IN VIVO</i></b>   | <b>59</b> |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 3.2.1.      | Diseños experimentales   | 59        |
| 3.2.1.1     | Modelo de nefrotoxicidad e inflamación en ratón <i>in vivo</i>   | 59        |
| 3.2.1.2.    | Modelo de nefrotoxicidad e inflamación intervenido mediante inhibidor del TLR4 en ratón <i>in vivo</i>   | 59        |
| 3.2.2.      | Procesamiento de los tejidos   | 59        |
| <b>3.3.</b> | <b>TÉCNICAS EMPLEADAS</b>  | <b>60</b> |
| 3.3.1.      | Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)  | 60        |
| 3.3.1.2.    | Marcaje del oligonucleótido consenso y unión   | 60        |
| 3.3.2.      | Western Blot   | 61        |
| 3.3.3.      | PCR en tiempo real.  | 62        |
| 3.3.4.      | ELISA  | 64        |
| 3.3.5.      | Ensayos de silenciamiento de la expresión génica mediante siRNA  | 64        |
| 3.3.6.      | Ensayos de Inmunofluorescencia   | 65        |
| 3.3.7.      | Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno por dihidroetidio (DHE)  | 66        |
| 3.3.8.      | Tinciones de inmunohistoquímica  | 67        |
| 3.3.9.      | Tinción tricrómica de Masson   | 67        |
| <b>3.4.</b> | <b>Análisis estadístico de los resultados</b>  | <b>68</b> |
| <b>4.</b>   | <b>RESULTADOS</b>  | <b>69</b> |
| <b>I.</b>   | <b>ESTUDIOS DE MECANISMOS Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PROINFLAMATORIAS INDUCIDAS POR LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA CICLOSPORINA A Y TAC EN CÉLULAS TUBULARES RENALES</b> | <b>71</b> |
| <b>4.1.</b> | <b>Análisis transcriptómico de genes inflamatorios inducidos por CsA y Tac en células tubulares murinas</b>  | <b>71</b> |
| 4.2.        | Los Inhibidores de Calcineurina desencadenan una respuesta inflamatoria rápida en células tubulares renales murinas en cultivo   | 73        |
| 4.3.        | La síntesis de citoquinas proinflamatoria inducida por los CNIs en células tubulares implica la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y STAT3                             | 74        |
| 4.4.        | La síntesis de citoquinas proinflamatorias y la activación de NF- $\kappa$ B por CsA y Tac está mediada por las proteínas quinasas JAK2 y JNK                          | 77        |
| 4.5.        | Los CNIs activan el receptor de la inmunidad innata TLR4 en células tubulares  | 80        |
| 4.6.        | Modulación por Nrf2 de la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B en células tubulares renales murinas  | 85        |
| <b>II.</b>  | <b>ESTUDIOS DE MECANISMOS Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PROINFLAMATORIAS INDUCIDAS POR LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA CICLOSPORINA A Y TAC EN CÉLULAS ENDOTELIALES</b>      | <b>86</b> |
| 4.7.        | Los CNIs inducen una respuesta inflamatoria rápida en células endoteliales microvasculares murinas en cultivo  | 86        |
| 4.8.        | Los CNIs inducen activación endotelial en células MS1  | 88        |
| 4.9.        | NF- $\kappa$ B se es un mediador de las respuestas proinflamatorias inducidas por los inhibidores de calcineurina en las células endoteliales                          | 88        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.10. Las rutas de transducción de JAK2 y JNK median la respuesta inflamatoria inducida por los CNIs en células endoteliales murinas   | 90         |
| 4.11. Los CNIs producen estrés oxidativo y la inhibición química de NADPH impide la síntesis de citoquinas proinflamatorias  | 92         |
| 4.12. Participación de receptores TLR en los eventos de señalización disparados por los CNIs en células endoteliales   | 93         |
| 4.13. El receptor TLR4 media la respuesta inflamatoria y la activación endotelial inducida por los CNIs en células endoteliales murinas  | 96         |
| <b>4.14. Papel del adaptador TRIF en la señalización por TLR4 inducida por CsA y Tac</b>   | <b>97</b>  |
| <b>4.15. Rol de calcineurina en la regulación de la respuesta inflamatoria inducida por los CNIs en células endoteliales</b>   | <b>99</b>  |
| <b>III. ESTUDIOS IN VIVO. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL INDUCIDA POR CICLOSPORINA Y PAPEL DE TLR4 EN ESTA RESPUESTA.</b>  | <b>104</b> |
| 4.16. La CsA induce nefrotoxicidad e inflamación renal <i>in vivo</i>  | 104        |
| 4.17. Activación de rutas proinflamatorias en biopsias de pacientes con trasplante renal y nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina  | 107        |
| 4.18. Intervención terapéutica de la nefrotoxicidad por CsA <i>in vivo</i> . Inhibición de rutas proinflamatorias dependientes de TLR4 con el inhibidor TAK-242  | 109        |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>  | <b>113</b> |
| 5.1. Producción de inflamación y caracterización de mecanismos inflamatorios inducidos por los CNIs en células tubulares y endoteliales  | 115        |
| 5.2. Producción de activación endotelial por los CNIs y caracterización de sus mecanismos en células endoteliales  | 119        |
| 5.3. Participación de receptores de la inmunidad innata como mediadores de la respuesta inflamatoria de los CNIs en células tubulares y endoteliales   | 120        |
| 5.4. Producción de ROS e implicación de los mecanismos de activación y supresión de estrés oxidativo sobre la señalización inflamatoria y de activación endotelial en células tubulares y endoteliales | 122        |
| 5.5. Papel regulador de calcineurina sobre los efectos inflamatorios inducidos por los CNIs en células tubulares y endoteliales  | 123        |
| 5.6. Efectos nefrotóxicos <i>in vivo</i> de CsA en modelo experimental animal  | 125        |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>   | <b>129</b> |
| <b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>133</b> |

|                   |            |
|-------------------|------------|
| <b>8. ANEXO A</b> | <b>157</b> |
| <b>9. ANEXO B</b> | <b>161</b> |



## Abreviaturas

A continuación se detallan todos los acrónimos y abreviaturas utilizados a lo largo de esta tesis. En la mayoría de ellos se ha conservado la nomenclatura y definición original en inglés por su amplio uso en el lenguaje científico .

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario.

ARN: ácido Ribonucleico.

ARNm: ácido Ribonucleico mensajero.

ATF: Activating Transcription Factor.

ATP: Adenosine Triphosphate/Adenosina 5'-trifosfato.

CaN: Calcineurin/Calcineurina.

CHOP: C/EBP homologous protein

CNIs: Calcineurin inhibitors/Inhibidores de Calcineurina.

Col: colágeno.

COX: ciclooxigenasa.

CsA: ciclosporina A.

DAMPs: Danger-Associated Molecular Patterns/Patrones moleculares asociados a daño.

DHR: Dominio de Homología Rel.

DM: *diabetes mellitus*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition/Transición epitelio-mesénquima.

ERK: Extracellular Regulated Kinase.

FKBP (tacrolimus): FK506 binding protein.

FN: Fibronectina.

FRA: Fracaso Renal Agudo.

Hmgb1: High-mobility group protein B1.

HO-1: Heme-Oxygenase 1/Hemo-oxigenasa.

## Abreviaturas

---

HSP: Heat Shock Proteins/Proteínas del choque térmico

ICAM: Intracellular Adhesion Molecule/Molécula de adhesión intracelular

IFN: interferón

I $\kappa$ B $\alpha$ : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha.

IKK: I $\kappa$ Bquinase

IL-1 $\beta$ : interleuquin 1 $\beta$ /Interleuquina 1 $\beta$

iNOS: inducible NO-synthase/Óxido nítrico sintasa inducible

IP-10: Interferon gamma-induced protein 10

IRF: Interferon response factor

IRAK: IL-1 Receptor Associated Kinase

JAK: Janus Kinase

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LDLox: oxidized low density lipoproteins/ lipoproteínas de baja densidad oxidadas.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico

LPS: Lipopolisacárido.

LRR: Leucine-Rich Regions/Regiones ricas en Leucina

LTA: Lipoteichoic Acid/Ácido lipoteicoico

LT $\beta$ R: Linfotoxin  $\beta$  Receptor/Receptor de linfotoxina  $\beta$

MAPK: Mitogen-Activated Protein-Kinases/proteínas quinasas activadas por mitógenos

MAPKK: mitogen-activated protein-kinases kinases

MAPKKK: mitogen-activated protein-kinases kinases kinases

MCP-1: monocyte chemotactic protein-1/Proteína quimiotáctica de monocitos

MEC: Matriz Extracelular

MMP: Matrix Metalloproteinase/Metaloproteína de matriz

mTOR: mammalian Target of Rapamycin

MyD88: Myeloid Differentiation primary response gene88

NFATc: Nuclear Factor of Activated T cells

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIK: NF- $\kappa$ B-inducing kinase

NK: Natural Killer.

NODM: New Onset Diabetes Mellitus/Diabetes mellitus de novo

NODAT: New Onset Diabetes After Transplant/Diabetes de novo post-trasplante

NOX: NADPH-oxidasa

Nrf2: Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns/Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR: Polymerase Chain Reaction/Reacción en cadena de la polimerasa.

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase/Fosfoinositol 3-quinasa

PKC: Protein Kinase C/Proteína quinasa C

PRRs: Pattern-Recognition Receptors/Receptores reconocedores de patrones

RAAS: Renin-angiotensin-Aldosterone System/Sistema renina-angiotensina-aldosterona

RANTES: Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted

ROS: Reactive Oxygen Species/Especies reactivas de oxígeno.

RT: Reverse Transcription Reaction/Reacción de transcripción inversa

SLN: señal de localización nuclear

SOD: Superóxido Dismutasa

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TAB: TAK1-binding protein

Tac: tacrolimus

TAK1: TGF- $\beta$  Activated Kinase 1/Proteína quinasa 1 activada por TGF- $\beta$

TCR: T Cell Receptor/Receptor de linfocitos T

TGF $\beta$ : Transforming Growth Factor beta 1/Factor de crecimiento transformante beta

TGF $\beta$ R: Transforming Growth Factor beta 1 receptor/receptor de TGF $\beta$

TLR: Toll-like receptor/Receptor de tipo toll.

TNF: Tumor Necrosis Factor/Factor de necrosis tumoral

TNF $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ /Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

## Abreviaturas

---

TRAF: Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor

TRIF: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-  $\beta$

TWEAK: Tumoral Necrosis Factor-like Weak inducer of Apoptosis

UPR: Unfolded Protein Response/Respuesta a proteínas sin plegar

VCAM: Vascular Cell Adhesion Protein

VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor/Factor de crecimiento vascular endotelial

# 1. Introducción



## 1.1. Papel de la inflamación en la patología renal

### 1.1. El Riñón. Generalidades

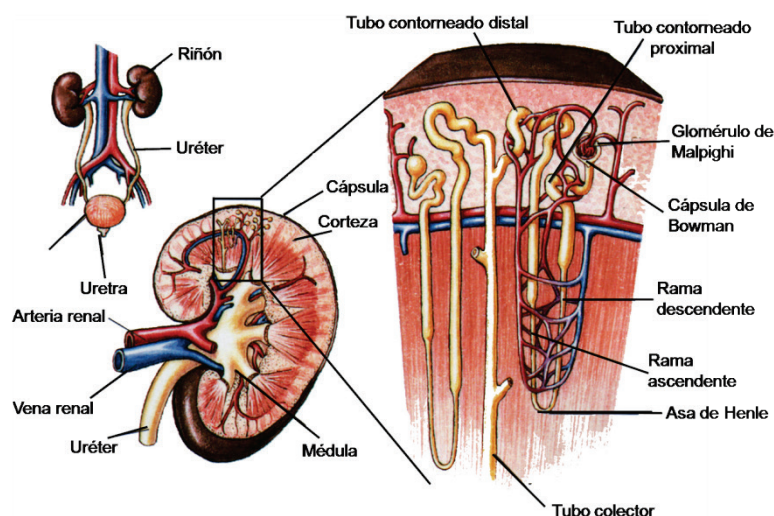
Los riñones son órganos vitales en los animales vertebrados terrestres; se hallan dorsalmente a ambos lados de la región lumbar de la columna vertebral y son los elementos centrales del sistema excretor. Además de la excreción de los productos nitrogenados de desecho del metabolismo transportados por la sangre, los riñones participan en otras funciones fundamentales: 1) homeostasis quimio-osmótica (mantenimiento del equilibrio hídrico y de electrolitos y ácido-base); 2) control de la eritropoyesis (regulación de la formación de los glóbulos rojos mediante secreción de hormona eritropoyetina; y 3) activación de la vitamina D (transformación de calcidiol en calcitriol).

Las funciones filtradora y excretora de los riñones se realizan en las unidades de filtración, denominadas nefronas. Cada nefrona consta de:

- Corpúsculo renal o de Malpighi (formado por glomérulo vascular y cápsula de Bowman).
- Túbulo contorneado proximal.
- Segmentos delgado y grueso del asa de Henle.
- Túbulo contorneado distal.

Histológicamente, los corpúsculos renales y los túbulos renales y distales forman la zona cortical del riñón, mientras que los segmentos del asa de Henle dan lugar a la médula

(Figura 1).



**FIGURA 1.** En la parte superior izquierda, el aparato excretor; debajo, sección anatómica del riñón que representa su topografía general. En la derecha, representación y localización cortical y medular de los elementos de la nefrona y los conductos colectores.

El proceso de filtración del plasma se produce en el glomérulo, conformado por una red de capilares arteriales y venosos

interconectados entre sí y un espacio perivascular denominado cápsula de Bowman. Mediante diferencias de presión, el plasma es filtrado al espacio pericapilar en forma de orina y desde allí discurre en por los distintos segmentos tubulares de la nefrona. En los túbulos proximales se reabsorben sustancias útiles para el organismo como iones, aminoácidos y glucosa; mientras que las sustancias de desecho se eliminan por la orina. El agua es reabsorbida a lo largo de toda la nefrona, especialmente en el asa de Henle.

### 1.1.2. Fisiopatología de la Inflamación renal

Las lesiones por toxicidad de xenobióticos (fármacos, toxinas, etc.), isquemia-reperfusión, nefropatía diabética o patologías autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, inducen respuestas adaptativas en los distintos tipos celulares del riñón. Así, las células renales, principalmente las del epitelio tubular, secretan citoquinas pro-inflamatorias que participan en el proceso inflamatorio en distintas etapas<sup>1,2</sup>. Bajo la acción de estas citoquinas, las células endoteliales expresan proteínas de adhesión, como selectinas y adhesinas, implicadas en la interacción y el anclaje de los leucocitos a la pared de los vasos sanguíneos<sup>3-5</sup>. Como contrapartida, las citoquinas originadas en el riñón también inducen una mayor expresión de integrinas leucocitarias que facilitan la adhesión de estas células a la superficie vascular, su pasaje a través de las paredes de los vasos (diapédesis) y su posterior extravasación hacia las regiones dañadas del tejido<sup>3,6,7</sup>. Las propias células endoteliales pueden secretar citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, constituyéndose en un elemento central de la fisiopatología del daño renal, como el producido por isquemia<sup>8,9</sup>. Recientemente, también se ha descrito la capacidad de los podocitos para sintetizar citoquinas proinflamatorias en respuesta a la hiperglucemia<sup>10</sup>.

En función del microambiente inflamatorio *in situ* (el contexto resultante de la acción en conjunto de citoquinas y otros factores pro-inflamatorios liberados por los tejidos), células del sistema inmune innato como los monocitos son desplazados desde el torrente circulatorio y se diferencian en macrófagos y células dendríticas en el tejido<sup>11-13</sup>. Otras células que maduran en la médula ósea como los neutrófilos y las células NK<sup>14-16</sup> también llegan al sitio inflamatorio por la acción de quimioquinas. En conjunto, los productos de secreción de todas las células de la inmunidad innata contribuyen al reclutamiento y activación de respuestas específicas de la inmunidad adaptativa.

Tras la reparación del daño original, la persistencia de las células inmunoefectoras puede sostener una inflamación crónica y una destrucción tisular progresiva, por lo que se debe producir una inhibición de la síntesis de quimioquinas a nivel local por agentes como el TGF- $\beta$ 1, prostaglandinas o una combinación de mediadores que causen apoptosis leucocitaria<sup>3,17</sup>. No obstante, tal como se ha descrito en la nefritis por LES y numerosos



modelos experimentales, la producción de TGF- $\beta$  conduce a fibrosis y daño glomerular irreversible<sup>18,19</sup>.

La infiltración de células del sistema inmune en el riñón se ha descrito como uno de los principales agentes causales del daño en las nefropatías<sup>11,20-24</sup>. La expresión de citoquinas previa a la infiltración de células inmunes ha sido descrita de forma especialmente clara en la nefritis lúpica y es un fenómeno habitual en los modelos de nefropatía experimental<sup>18,25,26</sup>.

La supresión de la inflamación mediante regulación de la actividad de células inmunes se ha propuesto como estrategia terapéutica para inhibir el daño renal. Así, el tratamiento con el inmunosupresor micofelonato mofetilo, el cual evita la proliferación de linfocitos B y T<sup>27</sup>, mejoró la inflamación y el daño renal hipertensivo en ratas. En la patología humana, el uso de micofelonato en combinación con rituximab, demostró efectividad en un ensayo piloto para tratar la nefritis lúpica<sup>28</sup>. Por otra parte, también se han reportado numerosos estudios sobre la inhibición de quimioquinas y sus correspondientes receptores como estrategia de prevención y restricción de la inflamación y el daño renal (detallado en el apartado 1.2.3).

## **1. 2. Mediadores Inflamatorios en la fisiopatología renal**

### **1.2.1. Factor de transcripción NF- $\kappa$ B**

El NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción formado por homo- o hetero-dimerización de miembros de la familia de proteínas Rel, que presenta cinco integrantes en los mamíferos: c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65) y Rel B. Todos los miembros de la familia presentan una región N-terminal altamente conservada con un tamaño en torno a 300 aminoácidos, el dominio de homología Rel (DHR)<sup>29</sup>. Ésta es la región responsable de unión al ADN, dimerización y acoplamiento a las proteínas inhibitorias de la familia I $\kappa$ B. El DHR también presenta una SLN que permite la translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo. Las subunidades p50 y p52 son sintetizadas, respectivamente, como p105 y p100 y en su activación por proteólisis media el proteasoma.

La actividad de los complejos NF- $\kappa$ B está modulada, principalmente, por las proteínas de la familia I $\kappa$ B, que actúan como represoras al mantenerse unidas a los dímeros e impedir que transloquen al núcleo. La familia se compone de I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3 y las formas precursoras NF- $\kappa$ B1 (p105) y NF- $\kappa$ B2 (p100)<sup>30</sup>. Su unión a los complejos NF- $\kappa$ B se produce en los dominios DHR de los dímeros, gracias a un número múltiple de regiones conservadas de ankirina; esta unión enmascara la SLN, bloqueando la translocación hacia el interior nuclear. En las formas precursoras, el DHR interactúa con un dominio

autoinhibitorio en el extremo C-terminal gracias a una región entre ambas rica en glicinas (Gly)<sup>31</sup> que le proporciona gran flexibilidad; es esta interacción la que encubre la SLN, inhabilitándola.

### 1.2.2. Señalización por la ruta NF- $\kappa$ B

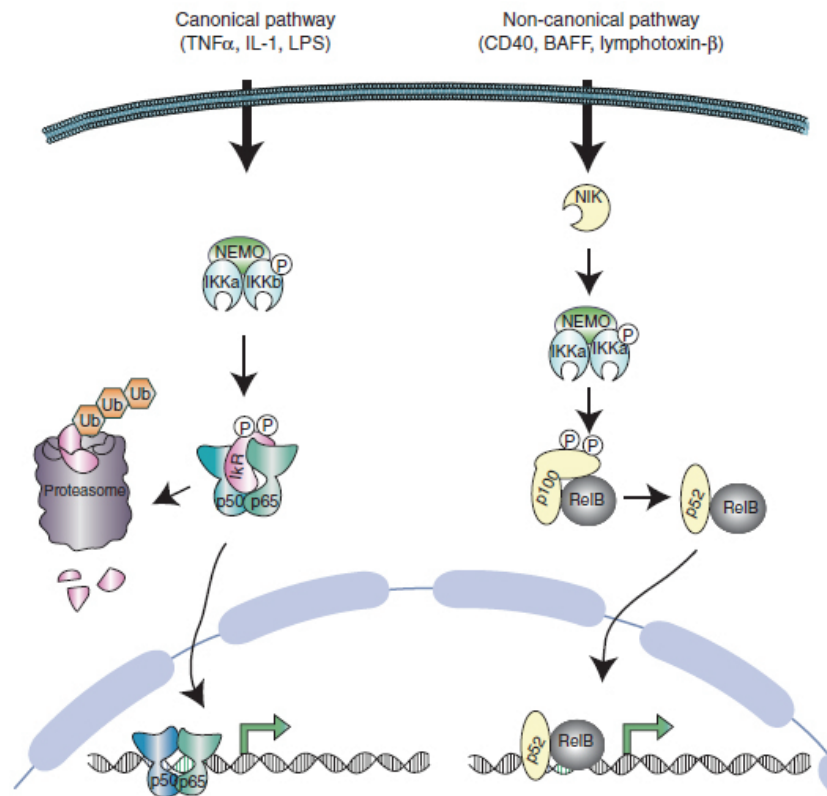
La señalización por el factor NF- $\kappa$ B ocurre por dos vías distintas.

En la vía denominada canónica, los complejos de NF- $\kappa$ B (normalmente dímeros p50/RelA) se hallan en el citoplasma acoplados a la proteína represora I $\kappa$ B e inactivos. Ante la acción de múltiples estímulos, como citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , interleuquina-1  $\beta$ /IL-1  $\beta$ ), mitógenos, proteínas de la cápside vírica, LPS bacteriano, ARN duplexo, factores de crecimiento, LDLox, estímulos inmunológicos y estrés físico o químico, se produce la activación de NF- $\kappa$ B; esto ocurre por fosforilación en dos serinas de la proteína represora (usualmente la subunidad inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ ), que queda así marcada para poliubiquitinación y su consecuente degradación por el proteasoma 26S<sup>32</sup>. Al eliminarse la proteína represora, la región SLN de NF- $\kappa$ B y puede de esta forma translocarse al núcleo. La fosforilación de la subunidad inhibidora (principalmente de I $\kappa$ B $\alpha$ ) es llevada a cabo por las subunidades catalíticas del complejo IKK, IKK- $\alpha$  o IKK-1 (85 KDa) e IKK-  $\beta$  o IKK-2 (87 KDa), reguladas a su vez por fosforilación. Éstas presentan en su extremo N-terminal un bucle canónico para las MAPKK, que es diana de fosforilación y activación mediante quinasas de la familia MAP3K, NIK, MEKK-1 y ciertas isoformas de PKC<sup>33–35</sup>. Además de las dos subunidades catalíticas de IKK anteriormente mencionadas, existe una subunidad adaptadora y reguladora, IKK $\gamma$ , necesaria para que el complejo se active y tenga actividad quinasas<sup>36</sup>. Así, el complejo IKK presenta un papel crítico en la activación de NF- $\kappa$ B<sup>37,38</sup> (**figura 2.**).

Aparte de la fosforilación de las proteínas I $\kappa$ B necesaria para la translocación y acoplamiento al ADN, la fosforilación de P65 es crítica para la actividad transcripcional de los dímeros de NF- $\kappa$ B. Se han descrito, al respecto, numerosas proteínas quinasas implicadas en estas modificaciones postraduccionales de NF- $\kappa$ B<sup>39–42</sup>. Además de por fosforilación, NF- $\kappa$ B también ve regulada su actividad transcripcional por metilación y acetilación<sup>40</sup>.

La vía no canónica o alternativa de NF- $\kappa$ B, por otro lado, responde ante una variedad de estímulos, entre ellos algunas moléculas de la súperfamilia TNF, como CD40<sup>43</sup>, el receptor de linfotoxina  $\beta$  (LT $\beta$ R)<sup>44</sup>, BAFFR<sup>45</sup> y, recientemente, Fn14<sup>46</sup>. La activación de la vía no canónica ocurre por procesamiento de p100, resultando, como se ha indicado, en la subunidad activa p52, que recluta a su vez a RelB; el heterodímero así formado puede translocar al interior del núcleo directamente<sup>47</sup> (mitad derecha de la **figura 2.**). Una de las

dianas de NF- $\kappa$ B más relevante es el factor quimiotáctico de linfocitos T, CCL21, con un papel clave en las lesiones renales por causar daño túbulointersticial vía quimiotaxis de fibrocitos<sup>48</sup>.



**Figura 2.** Vías de NF- $\kappa$ B (tomado de Oeckinghaus y Ghosh)<sup>32</sup> En la parte izquierda, la vía canónica, con la fosforilación de la IKK, fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y consecuente ubiquitinación y degradación en el proteasoma, lo que libera al dímero NF- $\kappa$ B y permite su internalización en el núcleo. En la mitad derecha de la imagen se muestra la vía no canónica, en la que la fosforilación de p100 resulta en su procesamiento catalítico hacia p52 y en la translocación del dímero al interior del núcleo.

Múltiples de los efectos fisiológicos dependientes de la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B se ha demostrado que requieren o se modulan por la acción concomitante de otras rutas de señalización, como las JAK/STAT<sup>49,50</sup> o las JNK<sup>51,52</sup>, y de otros factores de transcripción, como AP-1<sup>53,54</sup>. Igualmente, se ha descrito cómo la acción de otras rutas o factores de transcripción, como Nrf2<sup>55</sup>, CHOP<sup>56</sup> o ATF-3<sup>57</sup>, puede suprimir o bloquear estos mismos efectos de activación de NF- $\kappa$ B.

En el riñón, NF- $\kappa$ B regula la transcripción de genes inflamatorios<sup>58</sup> a nivel del epitelio tubular, podocitos, intersticio y el endotelio<sup>29,59,60</sup> en múltiples modelos de daño renal experimental, entre ellos los causados por isquemia-reperfusión<sup>61</sup>, glomerulonefritis inmune<sup>62</sup>, inflamación mediada por TWEAK<sup>63</sup> o el daño renal por xenobióticos como el cisplatino<sup>64</sup>. Además, evidencias funcionales directas del papel central de NF- $\kappa$ B como promotor de la inflamación y lesión renal, se obtuvieron mediante la administración

sistémica de secuencias nucleotídicas de ADN señuelo (“decoy”) para NF- $\kappa$ B, en modelos animales de alotrasplante<sup>65</sup>, glomerulonefritis<sup>66</sup> e isquemia-reperfusión<sup>67</sup>.

### 1.2.3. Citoquinas y quimioquinas

El incremento pronunciado de la síntesis y secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias es una característica de todos los modelos de daño renal agudo y crónico.

En la patología renal humana, se ha descrito la participación de un gran número de citoquinas pro-inflamatorias, sobre todo quimioquinas pero también interleuquinas e interferones. Una de las quimioquinas más relevantes es CCL2/MCP-1. Se ha descrito una correlación positiva entre el nivel de MCP-1 en la orina y la proteinuria e infiltración de macrófagos en pacientes con patologías del glomérulo<sup>68</sup>, así como en nefropatías por IgA, en las que en ciertos estadios MCP-1 va acompañada de IL-8<sup>69</sup>. Los altos niveles de MCP-1, junto a IL-8, además, aparecen en la nefropatía diabética de tipo 2<sup>70</sup> y la nefritis causada por LES<sup>71</sup>, en la que también se han confirmado niveles incrementados de TWEAK<sup>72</sup>.

Numerosos estudios de inhibición funcional, incluyendo el empleo de anticuerpos bloqueantes, quimioquinas truncadas o alteradas, o antagonistas e inhibidores farmacológicos de los receptores correspondientes, sugieren una participación crítica de las quimioquinas en las lesiones renales. En un trabajo pionero, el empleo de una proteína viral con efecto antagonista de amplio espectro sobre quimioquinas CC y CXC, significativamente redujo la expresión de MCP-1 y Rantes, la infiltración leucocitaria y la proteinuria en un modelo de glomerulonefritis experimental<sup>73</sup>. En otros estudios utilizando herramientas más específica, se ha descrito que tanto la deficiencia genética de MCP-1 como el bloqueo de CCR2 protegen frente la nefropatía diabética<sup>74</sup>. De forma similar, la ausencia de CCR2 en un contexto de nefritis por lupus, se asocia con supervivencia prolongada y reducción del daño renal<sup>75</sup>. En el caso de CCL5/RANTES, su delección genética también resultó en menor glomerulonefritis por administración de anticuerpos antiinmunes en ratones<sup>76</sup>. El empleo de anticuerpos neutralizantes de MCP-1, por otro lado, se ha comprobado que reduce múltiples parámetros de disfunción renal en la nefritis inducida por uso de suero nefrotóxico<sup>77-79</sup>. Se ha descrito también que el bloqueo de la señalización de los receptores CCR1 y CCR2, en modelos de FRA, reduce la infiltración intersticial de macrófagos y el daño<sup>80,81</sup>.

El bloqueo doble de los receptores CCR5 y CXCR3 también se ha determinado que obstaculiza la infiltración macrofagocitaria en caso de rechazo agudo de injerto renal<sup>82</sup>. De relevancia, se han desarrollado fármacos bloqueantes de CCR2, los que se ha demostrado que mejoran sustancialmente la nefropatía diabética<sup>83,84</sup>. Uno de ellos, el CCX140 es un

inhibidor oral cuya eficacia en el control metabólico, disminución de la proteinuria y mejora de la función renal en pacientes diabéticos fue probada en un ensayo clínico de fase 2 ya finalizado, y que actualmente [se está estudiando en un ensayo clínico de fase 3](#).

Aparte de estudios sobre la inhibición de MCP1 y Rantes, se ha descrito también cómo la inhibición de CXCL1, CCL7 y CCL20 impide la migración de neutrófilos y distintos linajes de células T hacia el riñón, con una consecuente mitigación del daño renal<sup>85-87</sup>. Otros muchos estudios describen cómo el bloqueo de quimioquinas obstaculiza o impide la infiltración glomerular o túbulointersticial de macrófagos, la fibrosis y la proteinuria en modelos de glomerulonefritis<sup>88-93</sup> y en la nefropatía diabética<sup>79</sup>.

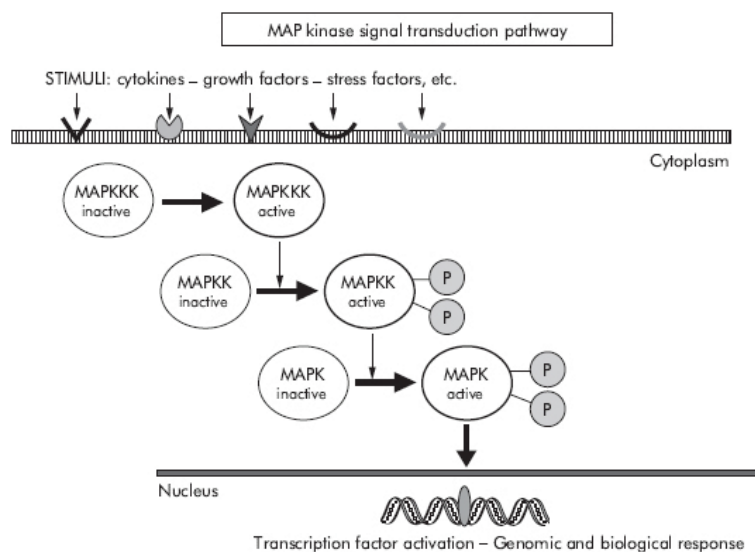
En conjunto, todos estos estudios ponen de manifiesto una participación fundamental de las quimioquinas y sus receptores en los procesos de daño renal.

#### **1.2.4. Vías de transducción de proteínas quinasas**

Las proteínas quinasas involucradas en la transducción de señales son capaces de activarse en respuesta a estímulos extracelulares o cambios del microambiente intracelular. Las MAPK<sup>94</sup> y la vía JAK/STAT<sup>95</sup> son vías de señalización frecuentemente involucradas en la regulación del daño renal.

##### **1.2.4.1. Vías de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos**

Todas las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) responden a un patrón general de activación, ya sea frente a estímulos extracelulares o cambios intracelulares, consistente en una cascada de fosforilaciones inducidas por quinasas: un primer activador (MAPKKK) activa por fosforilación otra quinasa (MAPKK), que a su vez fosforila la propia MAPK. Las quinasas en la cabeza de la cascada, las MAPKKK, son serina/treonina quinasas que usualmente son activadas por interacciones con proteínas pequeñas como las de la familia Ras/RhoA respondiendo a estímulos extracelulares<sup>96,97</sup>. Estas cascadas de MAP quinasas desembocan en fosforilaciones de factores de transcripción, fosfolipasas, proteínas relacionadas con el citoesqueleto u otras quinasas (MKs) de modo que el proceso amplifica la señal inicial (esquema en la **figura 3**). Se han identificado múltiples cascadas de MAPK en todos los organismos eucariotas, con funciones de control de la expresión génica, del metabolismo, de la mitosis; y de la supervivencia y proliferación. En los mamíferos se han identificado cinco grupos distintos de MAPKs: ERKs 1 y 2 (ERK 1/2), ERKs 3 y 4, ERK 5, p38 y JNK.



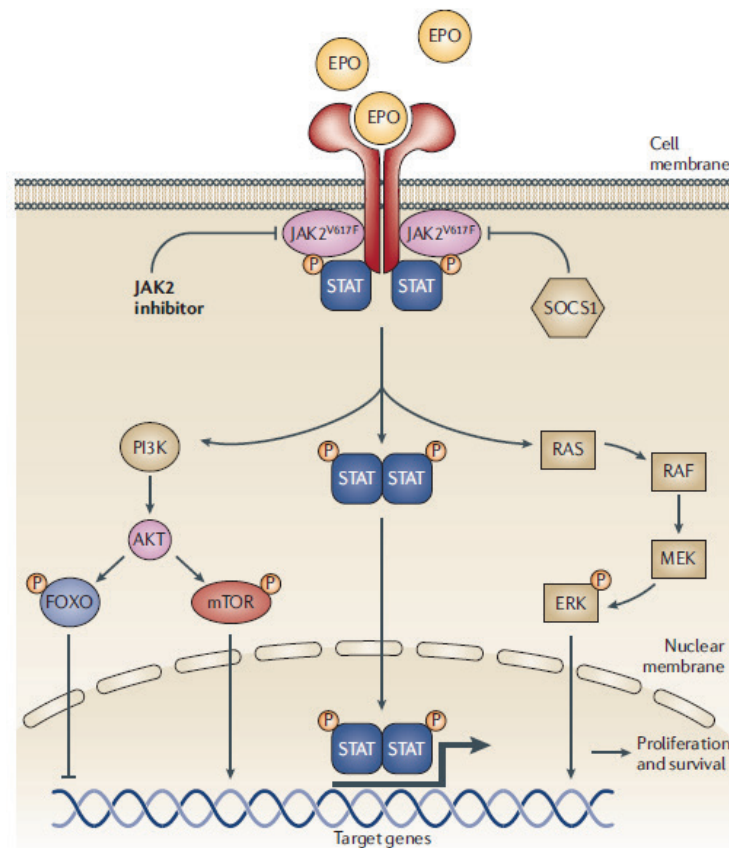
**Figura 3.** Esquema funcional de las cascadas MAPKs (tomado de Hommes et al, 2003)<sup>98</sup>.

Se ha descrito como el grupo de las JNK posee un gran número de substratos<sup>99</sup> y como esta diversidad de interacciones repercute en su participación en el equilibrio entre supervivencia y apoptosis<sup>100</sup> (habitualmente en un equilibrio con la señalización de NF- $\kappa$ B<sup>101</sup> o ERK<sup>102</sup>), como efector de la señalización por citoquinas,<sup>103</sup> y como regulador de la adhesión celular<sup>104</sup>. La activación de JNK se evidenció como importante en la inducción de muerte celular y daño tubular en modelos celulares y animales de isquemia-reperfusión<sup>105</sup> y nefrotoxicidad por cisplatino<sup>106</sup>.

### 1.2.4.2. Vías de señalización de las Janus quinasas

La vía de transducción de señales dependiente de las Janus quinasas (JAK/STAT) está asociada con la señalización por diversos tipos de moléculas (interferones, interleuquinas, hormonas)<sup>107,108</sup> y mutaciones y alteraciones en sus componentes desembocan en patologías diversas, siendo especialmente serios los procesos oncogénicos<sup>107,109,110</sup>. El patrón de activación de la ruta JAK/STAT resulta esencialmente similar en todos los miembros de la familia: ante la unión de la citoquina correspondiente al receptor, éste se dimeriza, lo que conduce al acoplamiento de las JAK. Seguidamente, las JAK primero se autofosforilan, incrementando su actividad, y a continuación fosforilan los dominios intracelulares de los receptores. Estas zonas de tirosinas fosforiladas de los receptores permiten el anclaje de las proteínas STAT, gracias a sus dominios SH2 (dominios tipo 2 de homología con Src), y su consecuente fosforilación por las mismas JAK. Esta fosforilación en las STAT permite su homo- o heterodimerización y su posterior translocación al núcleo, donde se unirán a regiones promotoras del ADN para facilitar la transcripción de genes

(figura 4.). La activación de ciertas JAK puede desembocar en la activación de otros ejes de señalización como el de la ruta de RAS o el de PI3K-Akt-mTOR<sup>110</sup>.



**Figura 4.** Ejemplo de la vía JAK/STAT con JAK2 (de Quintás-Cardama et al. 2011)<sup>110</sup>

Se ha demostrado un papel crítico de la ruta JAK/STAT en diversas patologías tumorales mieloproliferativas. En estas patologías, JAK es una diana terapéutica para la cual se han desarrollado una decena de inhibidores químicos, alguno de ellos testados en ensayos clínicos<sup>110,111</sup>. Dado que las proteínas JAK también están involucradas en la patogénesis de desórdenes inflamatorios y enfermedades autoinmunes, los inhibidores de JAK también están siendo testados en ensayos clínicos para el tratamiento de la artritis reumatoide, soriasis y rechazo del trasplante. En el contexto renal, la importancia de la vía JAK/STAT ha sido demostrada en modelos experimentales de glomerulonefritis y de nefropatía diabética<sup>112,113</sup>, donde se dispone de evidencias de que la inhibición de este eje de señalización mitiga el daño glomerular, así como en la enfermedad renal crónica<sup>114</sup>. Además, un papel de la ruta JAK/STAT promoviendo la fibrosis en el daño renal obstructivo, ha sido puesto de manifiesto mediante la inhibición farmacológica de STAT3<sup>115</sup>.

### 1.3. Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato forma parte de los mecanismos adaptativos frente al daño renal. Como ha sido resaltado más arriba, el conjunto de respuestas de la inmunidad adaptativa evoluciona a partir de la activación de respuestas de la inmunidad innata, tanto humorales (síntesis de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias) como celulares (activación de macrófagos, células dendríticas y células NK). La inmunidad innata se conforma de una panoplia de respuestas evolutivamente muy conservadas y que en conjunto constituyen un mecanismo básico de respuesta rápida (sin exposición previa a antígenos) en la defensa del hospedador contra la invasión de virus, bacterias y parásitos. Sin embargo, se conoce cada vez más sobre la importancia de los mecanismos de la inmunidad innata como iniciadores del daño tisular, cuando estos se activan en ausencia de infección<sup>116</sup>.

La inmunidad innata es evolutivamente temprana<sup>116,117</sup> y no requiere de exposición previa a los antígenos. Los tres componentes fundamentales de la respuesta inmune innata son la inflamación, la fagocitosis y el reclutamiento de células del sistema inmune<sup>118</sup>. Un elemento central en el desencadenamiento de la respuesta inmune innata es la activación de la familia de receptores TLR. Los TLRs se han clasificado como PRRs<sup>116</sup>, ya que identifican PAMPs<sup>119</sup>. Además, numerosos patrones moleculares endógenos denominados DAMP son también reconocidos por los TLRs y juegan un papel importante en el desarrollo de la patología renal<sup>120</sup>. Como ejemplo de DAMP asociadas al daño renal se puede citar especialmente a la proteína de la cromatina HMGB1, ampliamente involucrada en el daño isquémico experimental<sup>121</sup>. Otras DAMP cuya expresión está aumentada en el daño renal son la proteína del choque de calor HSP70, el proteoglicano biglicano y el mucopolisacárido hialuronano<sup>122,123</sup>.

Se han descrito 10 TLRs en humanos y 12 en ratones: el TLR2 es activado tanto por lipoproteínas como por peptidoglucanos; el TLR4 es activado por el lípido A (componente del LPS de bacterias Gram negativas); TLR5 se activa por flagelina; el RNA duplexo viral es reconocido por TLR3, mientras que el simplexo y derivados sintéticos de nucleótidos activan los TLRs 7 y 8; y las secuencias CpG no metiladas de ADN bacteriano son reconocidas por el TLR9<sup>116,124</sup>. Aunque TLR10 fue identificado en humanos, de momento se desconoce su ligando, mientras que TLR11 sólo se ha expresado en ratones y se ha descrito que es muy relevante en la respuesta inmune contra bacterias uropatógenicas<sup>125</sup>. TLR1 y TLR6, los únicos que no tienen ligando específico, por lo que heterodimerizan con TLR2 y de esta forma se logra aún más diversificación de la respuesta<sup>126</sup>. En cuanto a la ubicación subcelular, los TLRs 3, 7, 8 y 9 (aquellos relacionados con reconocimiento de ácidos



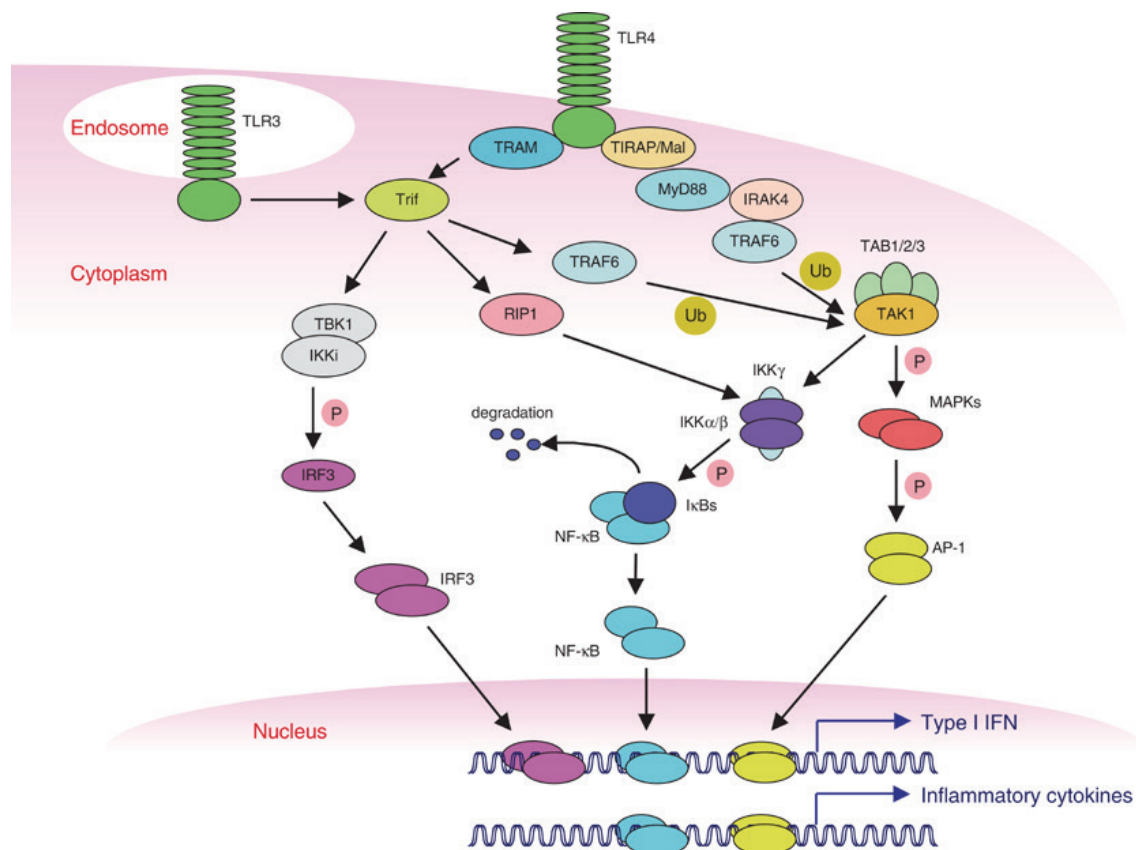
nucleicos) aparecen en compartimentos intracelulares, mientras que los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6, se disponen a través de la membrana plasmática<sup>116,124</sup>.

El mecanismo de activación de los TLRs se halla muy conservado. Para todos los TLR, el inicio de la señalización es dependiente de las proteínas adaptadoras MyD88 y TRIF, salvo para el caso de TLR3 que se activa únicamente por adaptación mediante TRIF. La activación de los TLRs depende del contacto de los ligandos con los dominios LRR, en cuyos estudios se ha comprobado un alto grado de conservación evolutiva<sup>127</sup>. Se ha descrito como las LRRs, localizadas en el extremo N-terminal y extracelular de los TLRs, son los elementos claves funcionales de diversos TLRs<sup>128,129</sup>. Además, las proteínas accesorias MD2 y CD14 son necesarias para el correcto reconocimiento del LPS por parte del TLR4<sup>130-132</sup>.

Una vez que un ligando es reconocido por algún TLR, en la vía dependiente de MyD88 se forma el "mydosoma", un complejo en el que son reclutadas múltiples proteínas en torno a MyD88<sup>133</sup>. Las primeras en ser reclutadas son las proteínas IRAK<sup>134</sup>: con la activación del TLR, MyD88 recluta a IRAK4, que a su vez recluta a IRAK-1, que se autofosforila<sup>135,136</sup> y recluta a la proteína TRAF6<sup>137,138</sup>. TRAF6 amplía el complejo induciendo el acoplamiento de TAK1, TAB1 y TAB2, que resulta en la fosforilación de TAK1 y TAB2. La fosforilación de TAK1 resulta en su activación y la fosforilación de las IKKs, iniciando la vía NF- $\kappa$ B, que sigue el curso descrito previamente.

La vía de TAK1 también puede activar las rutas de MAPKs<sup>139</sup>, como ERK<sup>140</sup>, p38<sup>141</sup> y JNK<sup>142</sup>, así como de la PI3K<sup>143,144</sup>. Se ha comprobado también que la actividad del eje JAK/STAT puede ser iniciada por los TLRs<sup>51,145</sup>.

El mecanismo de activación independiente de MyD88 es el único activado por TLR3, si bien también puede ser iniciado por TLR4. La proteína clave de esta vía es TRIF que acopla tanto con TLR3 como con TLR4<sup>146-148</sup>. El efector final de la ruta es IRF3, que resultará fosforilado y se internalizará al núcleo, participando en la expresión de diversos sustratos, como IFN-  $\beta$ , IP10 o RANTES<sup>149,150</sup>.



**Figura 5.** Vías de señalización activadas por los TLRs (tomado de Kawai & Akira)<sup>124</sup>.

El sistema de los TLRs como elemento de defensa en la inmunidad innata, sin embargo, puede activarse en ausencia de patógenos externos y resultar en patologías autoinmunes por reconocimiento de moléculas propias<sup>151</sup> o por mutaciones en elementos de su ruta de transducción<sup>152</sup>. La acción patológica de diversos TLRs dentro del contexto renal ha sido documentada en numerosas condiciones patológicas experimentales, a saber, glomerulonefritis, nefritis lúpica, nefropatía a virus de la hepatitis C y nefropatía diabética<sup>153–157</sup>. Por otro lado, en modelos animales simulando un proceso intrínseco del riñón, como es el rechazo del aloinjerto, se ha determinado la participación de TLR2 y TLR4, normalmente de forma asociada a procesos de isquemia-reperfusión<sup>122,158,159</sup>. También se ha determinado que la inflamación y el daño renal resultantes del tratamiento con cisplatino están mediados por TLR4<sup>106</sup>.

### 1.4. Otras respuestas adaptativas dependientes de estrés

Ante estímulos lesivos y estrés ambiental, las células reaccionan mediante una serie de respuestas adaptativas que les permiten recuperar su homeostasis. Entre estas respuestas se hallan las vías de supervivencia, en las que están implicadas algunas de las rutas de transducción ya mencionadas, como la de NF-κB o algunas de las rutas de MAPKs,

que antagonizan frente a la apoptosis. No obstante, también existen rutas adicionales como la de UPR<sup>160</sup>, que evita el plegamiento defectuoso de proteínas debido al estrés del retículo endoplásmico, o la del factor de transcripción Nrf2<sup>161</sup>, que regula una batería de genes con efecto citoprotector, especialmente frente a desequilibrios del estado redox celular y la generación de ROS. La ruta de Nrf2 es especialmente interesante como respuesta antiinflamatoria debido a las interacciones antagónicas descritas con NF-κB<sup>162</sup> pero tanto esta como la UPR presentan actividad frente a fuentes de estrés y daño en riñón<sup>163–165</sup>. Experimentos con cultivos de células renales humanas han demostrado la relevancia de Nrf2 en la defensa frente a citotoxicidad por ROS<sup>166</sup> y la inhibición de la transición epitelio-mesenquimal inducida por TGF-β1<sup>167</sup>. Además, diversos modelos experimentales han demostrado que la activación de Nrf2 ofrece protección significativa frente a distintas etiologías de daño renal, como el daño por isquemia-reperfusión<sup>168,169</sup> o la transición epitelio-mesénquima inducida por ciclosporina A<sup>170</sup>, y que su ausencia o actividad reducida es un factor de agravamiento del daño<sup>171–173</sup>. En la patología renal humana, Nrf2 es una diana terapéutica para la nefropatía diabética y los efectos de su inhibición han sido estudiados en numerosos ensayos clínicos<sup>55,164</sup>.

## 1.5. Inhibidores de calcineurina

### 1.5.1. Bases farmacológicas del uso de inhibidores de calcineurina como inmunosupresores en el alotransplante

En el alotransplante de órganos, uno de los principales factores de fracaso del injerto es el rechazo. Como medida de prevención del rechazo se recurre al uso de fármacos inmunosupresores. El principal agente inmunosupresor de primera generación fue la ciclosporina A, originalmente aislada del hongo *Tolypocladium inflatum*. La CsA es un péptido cíclico de producción no ribosomal con un solo aminoácido D y que en su uso inmunosupresor afecta a las células T, reduciendo su actividad<sup>174</sup>. A nivel molecular, el uso de la CsA se basa en la inhibición de la calcineurina (Proteína fosfatasa 3, anteriormente PP2B, proteína fosfatasa 2B o CaN). Esta enzima es también la diana molecular de uno de los fármacos de una generación posterior, el tacrolimus, aislado de *Streptomyces tsukubaensis*, y que se ha empleado también contra el rechazo en alotrasplantes como la ciclosporina.

Si bien tanto ciclosporina como tacrolimus se clasifican como inhibidores de calcineurina, su mecanismo molecular es sutilmente distinto: ambas moléculas inhiben la actividad fosfatasa de la CaN por acoplamiento a ésta mediante la intermediación de otras proteínas. La ciclosporina forma un complejo con proteínas de la familia de las ciclofilinas,

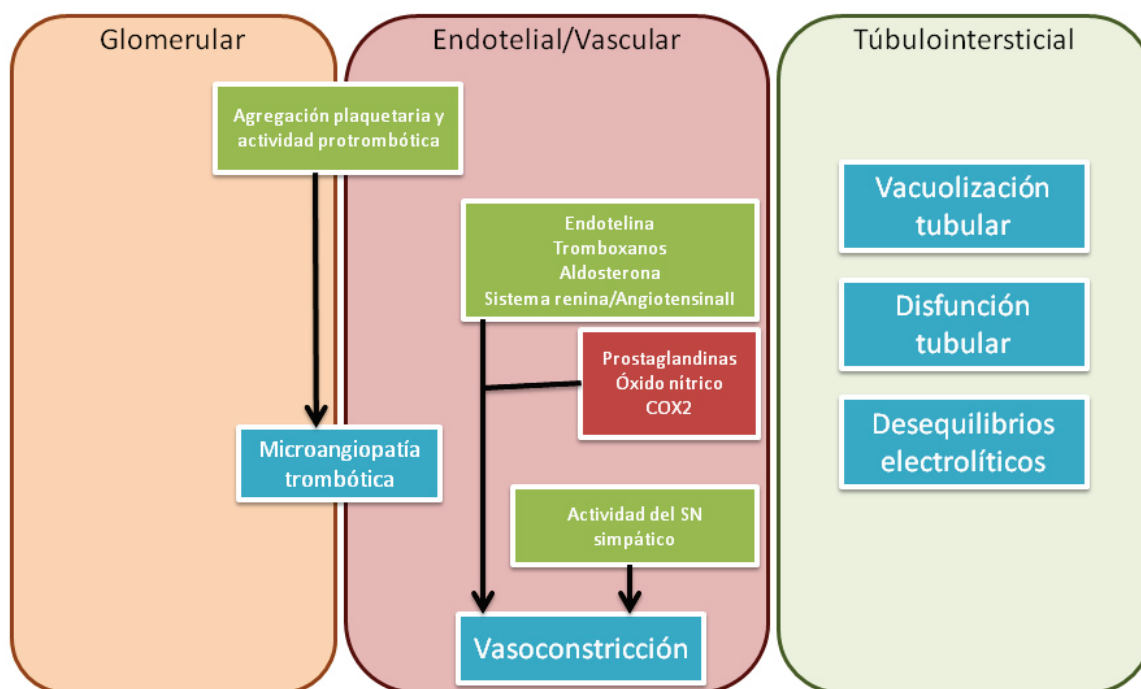
como ciclofilina A, mientras que el tacrolimus requiere de inmunofilinas, como la FKBP12. Por tanto, es el complejo entre cada macrólido y su proteína peptidil-prolil-isomerasa el que se une a CaN bloqueando su actividad fosfatasa<sup>175,176</sup>. Este bloqueo se enmarca en el mecanismo de activación de los linfocitos T: básicamente, ante la activación del TCR, se produce la liberación de calcio del retículo endoplásmico y la consecuente activación de calmodulina, que a su vez activa a la CaN. Consecuentemente, esta CaN activada actúa sobre NFATc produciendo su desfosforilación y translocación al interior del núcleo donde se acopla a los promotores de genes de citoquinas, operando en concierto con otros factores de transcripción<sup>177,178</sup>.

La CaN es un heterodímero formado por una subunidad catalítica, calcineurina A (CaNA) en la que reside la actividad fosfatasa y una subunidad reguladora, calcineurina B (CaNB). Se han documentado tres isoformas de CaNA, denominadas con letras griegas,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , de distribución tisular desigual: mientras que la isoforma  $\gamma$  es estrictamente testicular y la isoforma  $\beta$  es mayoritaria en el tejido nervioso, la isoforma  $\alpha$  es la principal en el resto de tejidos. En lo que respecta a la subunidad reguladora, la CaNB tiene dos isoformas, clasificadas como 1 y 2<sup>179,180</sup>. La CaN posee un papel clave en la regulación de múltiples vías de transducción intracelulares<sup>181</sup>, además de haberse demostrado su papel en la producción de MCP-1<sup>182</sup> e inflamación<sup>183</sup>, en la respuesta de los linfocitos B<sup>184</sup>, en la de monocitos<sup>185</sup> y en la de monocitos<sup>186</sup>.

### **1.5.2. Patología renal aguda y crónica asociada al uso de inhibidores de calcineurina**

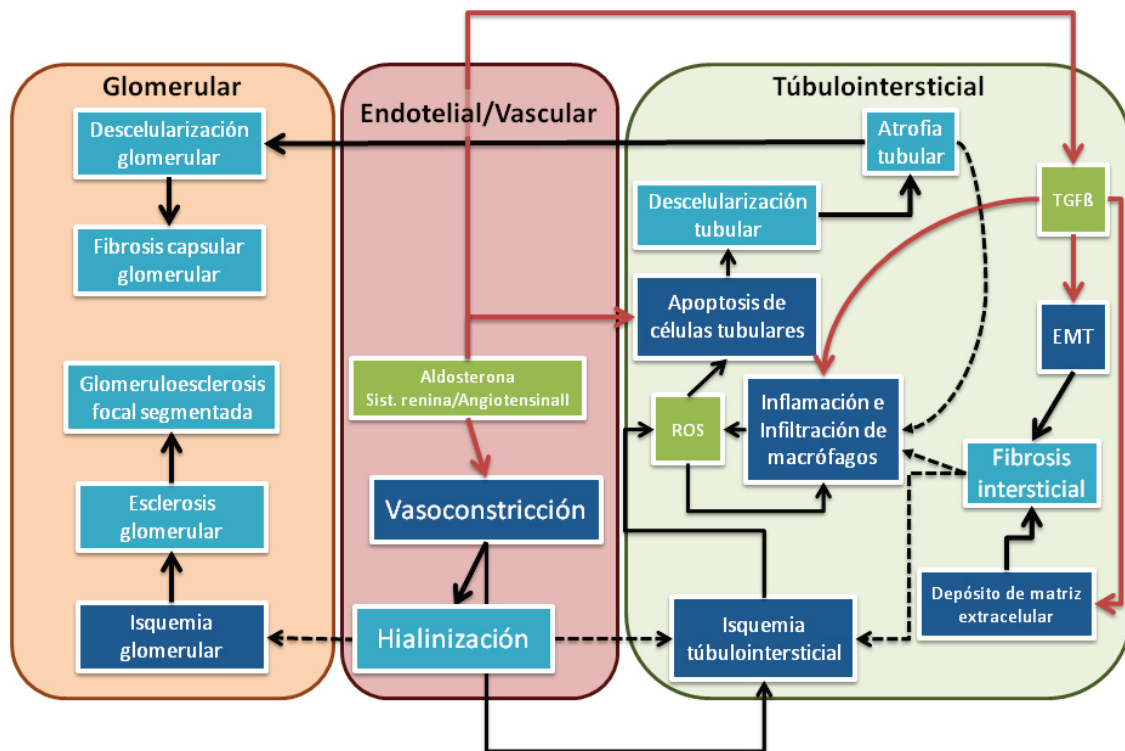
El efecto de los CNIs no queda restringido a los linfocitos T y su uso conlleva efectos secundarios que van más allá de la inmunosupresión. La acción de los CNIs sobre el riñón causa nefrotoxicidad severa a largo plazo, repercutiendo seriamente sobre la viabilidad del injerto, comprometiendo la función renal y la supervivencia del paciente e incrementando la morbilidad. El cuadro de toxicidad generado por ambos CNIs, CsA y tacrolimus, es similar, consistiendo en apoptosis, inflamación y fibrosis. Así, pacientes en tratamiento prolongado con CNIs sufren un deterioro crónico de su función renal<sup>187</sup> y, en caso de ser el propio riñón el órgano trasplantado, puede conducir a la pérdida del injerto<sup>188,189</sup>. Se ha determinado que, aunque tacrolimus tiene una efectividad contra el rechazo agudo mayor que CsA<sup>190-192</sup>, ninguno de los dos tiene ventajas sobre el otro en lo concerniente a la nefrotoxicidad<sup>193,194</sup>. Por otra parte, se ha apuntado que tacrolimus tiene mayor tendencia a originar NODAT<sup>195</sup>. Adicionalmente, el uso de tacrolimus va acompañado de mayores efectos fibróticos<sup>196</sup>, neurológicos y gastrointestinales<sup>192</sup>, mientras que el tratamiento con ciclosporina lleva asociado mayor riesgo cardiovascular<sup>197</sup>.

Los efectos adversos de los CNIs se han agrupado en agudos o crónicos; la nefrotoxicidad aguda por CNIs se caracteriza por ser un fenómeno relacionado principalmente con las alteraciones hemodinámicas y reducción de la tasa de filtrado glomerular y que es reversible mediante reducción de la dosis o remplazo por inhibidores de mTOR<sup>198,199</sup>. Una posible base genética de la sensibilidad a los CNIs resultante en nefrotoxicidad aguda ha sido objeto de estudio<sup>200</sup>. Los efectos de la nefrotoxicidad aguda por CNIs se indican en la **figura 6**.



**Figura 6.** Patogenia de la nefrotoxicidad aguda por CNIs en distintos compartimentos celulares. En las cajas en verde se indican los parámetros incrementados; en rojo los reducidos y en azul los efectos finales. Los rótulos de cada caja grande indica el nivel renal de los eventos. Adaptado de Naessens et al. (2009)<sup>187</sup>

La nefrotoxicidad crónica, además de perturbaciones hemodinámicas similares a las del proceso agudo, presenta un cuadro de deterioro irreversible de las funciones del riñón, resultado de daño microvascular, tubulointersticial y glomeruloesclerosis<sup>188,189</sup>. De este modo, aunque el resultado observado mediante la medida de la función renal por la tasa de filtrado glomerular sea similar, las causas subyacentes son distintas a las de la aguda y se producen por la pérdida de integridad anatómica-funcional del riñón. Los efectos de nefrotoxicidad crónica se indican en la **figura 7**.



**Figura 7.** Patogénesis de la nefrotoxicidad crónica por CNIs. En verde se indican los parámetros incrementados; en azul oscuro, los efectos fisiológicos y en azul claro las consecuencias patológicas del tratamiento con CNIs. Las líneas en rojo indican iniciación del proceso, las líneas continuas delgadas en negro indican procesos resultantes efectos fisiológicos; las líneas discontinuas señalan retroalimentación de ciertos efectos finales sobre efectos fisiológicos; y las líneas continuas gruesas en negro indican cadenas de efectos finales. Adaptado de Naessens et al. (2009)<sup>187</sup>

### 1.5.3. Participación de calcineurina en los efectos nefrotóxicos de los inhibidores de calcineurina

Si bien se han documentado extensamente en los últimos 40 años los efectos nefrotóxicos de los CNIs<sup>187,201</sup>, su efectividad contra el rechazo agudo sigue siendo garante de su uso en pacientes con trasplantes y, a día de hoy, el enfoque clínico reside en el control del régimen de estos CNIs, sus dosis y su alternancia o uso conjunto con otros inmunosupresores, como los inhibidores de mTOR.

La relevancia de la CaN para el correcto desarrollo y función de los riñones ha sido demostrada por estudios en ratones defectivos para la subunidad catalítica de esta fosfatasa<sup>202,203</sup>. La ausencia de CaN $\beta$  afecta principalmente al sistema inmune, mientras que la falta de CaN $\alpha$  conduce a defectos en el desarrollo postnatal del riñón<sup>203</sup>. Además la carencia de CaN $\alpha$  es suficiente para producir nefrotoxicidad, expresión incrementada de TGF- $\beta$  y fibrosis similares a las observadas en la nefrotoxicidad crónica por CNIs<sup>204</sup>. Estos estudios sugieren que los efectos nefrotóxicos de los CNIs podrían estar mediados por CaN $\alpha$ . Se basan, sin embargo, en modelos murinos defectivos, mientras que la acción de CaN se basa en la interacción con la enzima y la inhibición de su actividad catalítica. Al

respecto, no se han encontrado diferencias en la actividad de CaNA en pacientes trasplantados comparados con sujetos control y no hay estudios sobre la regulación de la actividad de CaN renal en estos pacientes.

No obstante, lo paradójico de que los CNIs sean inmunosupresores en linfocitos T pero estimulen la inflamación y la infiltración de macrófagos en el riñón coincide con observaciones en las que la inhibición de CaN por CNIs promueve la inflamación en macrófagos en contraste con su papel antiinflamatorio en linfocitos<sup>205</sup>. Se ha postulado que esto podría deberse a la existencia de interacciones de CaN con los receptores TLR que impedirían la activación de estos últimos. Por el contrario, la interacción de CaN con los CNIs dejaría libres a los TLRs y dispararía de forma espontánea la señalización pro-inflamatoria<sup>205</sup>. Análogamente, podría pensarse que la implicación de la CaN como freno de la respuesta inmune innata podría tomar parte en los efectos pro-inflamatorios de los CNIs a nivel renal.

Se ha comprobado que las células endoteliales tienen un papel clave en fenómenos de daño renal<sup>8,59,206</sup>. Además de los efectos conocidos sobre la presión sanguínea, existen evidencias concretas de que los CNIs tienen actividad citotóxica sobre las células endoteliales<sup>207-209</sup>. Sin embargo, la participación de la CaN en estos efectos no se ha abordado de forma específica. De forma relacionada, se ha sugerido la participación de ciclofilinas independientemente de CaN como base del mecanismo nefrotóxico de CsA en las células endoteliales. En este estudio, formas inactivas de CsA con capacidad de acoplamiento a ciclofilina A reproducen los efectos de CsA sobre la secreción de VEGF y citotoxicidad en cultivos de células endoteliales<sup>210</sup>. Además, en un modelo murino de hialinosis arteriolar por tacrolimus, la inhibición de CaN no modifica los efectos del fármaco como inductor de TGF- $\beta$  y fibrosis en la aorta<sup>207</sup>. Estos estudios sugieren que los efectos adversos de los CNIs en el endotelio renal pueden ser independientes de CaN, aunque no puede descartarse que esta interacción sea relevante sobre otros efectos tóxicos de los CNIs sobre los endotelios.

## **1.6. Modelos experimentales de nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina**

La nefrotoxicidad inducida por los CNIs fue originalmente descrita en humanos a partir de la observación directa de los daños agudos y crónicos en biopsias de riñones trasplantados<sup>187</sup>. Sin embargo, el control de los efectos nefrotóxicos en pacientes tratados con CNIs resulta difícil ya que su diagnóstico requiere el empleo de técnicas invasivas y las lesiones histológicas renales no pueden ser atribuidas específicamente a la acción de los

## 1. Introducción

CNIs a menos que se descarten otros procesos patogénicos concurrentes. La clara necesidad del estudio de los efectos y mecanismos nefrotóxicos de los CNIs ha resultado en la realización de numerosos modelos experimentales en animales. En la mayoría de estos estudios, se emplean parámetros funcionales (la tasa de filtrado glomerular, los niveles de creatinina y de urea en suero y orina; y la proteinuria) acompañando a análisis morfohistológicos, de forma similar a como se estudia en pacientes<sup>198</sup>.

En la **Tabla 1** se detallan diversos modelos para una comparación de periodos y dosis de tratamiento y sus distintos objetivos.

| Fármaco | Dosis            | Vía             | Periodo de Tratamiento | Animal | Objetivos   | Fuente                               |
|---------|------------------|-----------------|------------------------|--------|---|--------------------------------------|
| CsA     | 5 mg/Kg/día      | Oral (sonda)    | 3/9 semanas            | Rata   | Transición de disfunción renal a nefrotoxicidad                                     | Sereno et al. 2014 <sup>211</sup>    |
| CsA     | 15 mg/Kg/día     | Oral (sonda)    | 12 semanas             | Rata   | Reducción de nefrotoxicidad mediante co-tratamiento con eplerrenona.                | Nielsen et al. 2013 <sup>212</sup>   |
| CsA     | 3/6/10 mg/Kg/día | Oral (sonda)    | 28 días                | Rata   | Efectos de co-tratamiento de CsA con sirolimus y everolimus sobre metabolismo renal | Bohra et al. 2012 <sup>213</sup>     |
| CsA     | 10 mg/Kg/día     | Oral (sonda)    | 28 días                | Rata   | Efectos de dieta baja en sal sobre metabolismo renal bajo CsA.                      | Klawitter et al. 2012 <sup>214</sup> |
| CsA     | 15 mg/Kg/día     | Intraperitoneal | 1 mes                  | Rata   | Papel de NOX2 en nefrotoxicidad   | Djamali et al. 2012 <sup>215</sup>   |
| CsA     | 30 mg/Kg/día     | Intraperitoneal | 2 meses                | Ratón  | Vasoconstricción cortical renal y papel de RGS4                                     | Siedlecki et al. 2010 <sup>216</sup> |
|         | 250 mg/Kg/día    |                 | 7 días                 | Ratón  |   |                                      |
| CsA     | 250 mg/Kg/día    | Subcutánea      | 5 días                 | Ratón  | Efecto de inhibición de JAK2 sobre nefrotoxicidad                                   | Neria et al. 2009 <sup>208</sup>     |

**Tabla 1.** Modelos animales de nefrotoxicidad por CNIs.



| Fármaco | Dosis           | Vía             | Periodo de Tratamiento | Animal | Objetivos   | Fuente                               |
|---------|-----------------|-----------------|------------------------|--------|---|--------------------------------------|
| CsA     | 10/25 mg/Kg/día | Oral (sonda)    | 6/28 días              | Rata   | Metabolitos alterados en tiempos breves y largos de tratamiento con Sirolimus y CsA   | Klawitter et al. 2009 <sup>217</sup> |
| CsA/Tac | 15/6 mg/Kg/día  | No indicado     | 30/70 días             | Rata   | Comparación de co-tratamientos de CsA y Tac con sirolimus   | Lloberas et al. 2008 <sup>218</sup>  |
| CsA     | 25 mg/Kg/día    | Intraperitoneal | 5 semanas              | Ratón  | Prevención de nefrotoxicidad con anticuerpo neutralizante de IL-6   | LaSpina et al. 2008 <sup>219</sup>   |
| CsA     | 15 mg/Kg/día    | Subcutánea      | 4 semanas              | Rata   | Efecto de Angiotensina II en la expresión de TLR2 y maduración de las células dendríticas en nefrotoxicidad por CsA.                | Ahn et al. 2007 <sup>220</sup>       |
| Tac     | 0,25 mg/Kg/día  | No indicada     | 90 días                | Rata   | Modelo de trasplante con nefrotoxicidad intervenida por anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$ y papel de las subunidades de NOX. | Khanna & Pieper. 2007 <sup>221</sup> |
| CsA     | 15 mg/Kg/día    | Subcutánea      | 4 semanas              | Rata   | Inducción de Expresión de TLR2 y TLR4 y maduración de células dendríticas en riñón.   | Lim et al. 2005 <sup>222</sup>       |
| CsA     | 15 mg/Kg/día    | Subcutánea      | 1/4 semanas            | Rata   | Efecto de pravastatina sobre la nefrotoxicidad por CsA  | Li et al. 2004 <sup>223</sup>        |

**Tabla 1. (continuada)** Modelos animales de nefrotoxicidad por CNIs.

## 1. Introducción

| Fármaco | Dosis          | Vía                         | Periodo de Tratamiento | Animal | Objetivos  | Fuente                             |
|---------|----------------|-----------------------------|------------------------|--------|--|------------------------------------|
| CsA     | 30 mg/Kg/día   | Subcutánea                  | 14/21 días             | Rata   | Reducción de nefrotoxicidad mediante HGF.                                    | Mizui et al. 2004 <sup>224</sup>   |
| CsA     | 30 mg/Kg/día   | Subcutánea                  | 4 semanas              | Ratón  | Intervención mediante anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$               | Ling et al. 2003 <sup>225</sup>    |
| CsA/Tac | 15/3 mg/Kg/día | Oral (sonda)                | 2 semanas              | Rata   | Estudio morfofuncional renal en co-tratamientos de CsA y Tac con sirolimus   | Nielsen et al. 2003 <sup>226</sup> |
| CsA/Tac | 15/5 mg/Kg/día | Oral (sonda)                | 1 semana               | Rata   | Reducción de la expresión de COX-2 por CNIs y acción de inhibidor de la ACE. | Höcherl et al. 2002 <sup>227</sup> |
| Tac     | 5 mg/Kg/día    | Oral (sonda)                | 4 semanas              | Rata   | Estudio de hipertensión y efectos sobre eNOS y Endotelina-1                  | Takeda et al. 1999 <sup>228</sup>  |
| CsA     | 5 mg/Kg/día    | Inyección                   | 1/2/8 semanas          | Rata   | Niveles de TGF- $\beta$ y fibrosis intersticial.                             | Vieira et al. 1999 <sup>19</sup>   |
| CsA     | 18 mg/Kg/día   | Oral (sonda)                | 3 semanas              | Rata   | Efectos sobre iNOS y eNOS de CsA.  | Vaziri et al. 1998 <sup>229</sup>  |
| CsA/Tac | 15/6 mg/Kg/día | Subcutánea/<br>Oral (sonda) | 14 días                | Rata   | Estudio comparativo de nefrotoxicidad aguda por CsA, Tac y rapamicina.       | Andoh et al. 1996 <sup>230</sup>   |
| CsA     | 15 mg/Kg/día   | Subcutánea                  | 5/10/26/35 días        | Rata   | Infiltración de macrófagos precedente a fibrosis.                            | Young et al. 1995 <sup>231</sup>   |

**Tabla 1. (continuada)** Modelos animales de nefrotoxicidad por CNIs.

La mayoría de estos estudios tienen una duración superior a la semana. En aquellos con una duración inferior, los efectos de daño estructural o fibróticos no son muy apreciables en esos periodos de tiempo<sup>231</sup>, si bien se suelen orientar al estudio de dianas o efectos muy específicos que aparecen a tiempos menores<sup>217,227</sup>, o emplean una dosis significativamente más altas para obtenerlos<sup>208,216</sup>. TGF-  $\beta$  es una de las dianas recurrentes en los diversos modelos y en algunos de ellos se realizaron intervenciones terapéuticas con anticuerpos neutralizantes de la citoquina que, de acuerdo a lo esperado, resultaron en inhibición de la fibrosis<sup>19,221,225</sup>. También se ha estudiado la intervención sobre el eje renina-angiotensina<sup>220,227</sup> y la acción de los inhibidores de mTOR en combinación con alguno de los CNIs<sup>213,218,226</sup>. Mediante estos modelos también se ha comprobado el papel de las especies reactivas de oxígeno<sup>215,221</sup> y los efectos adversos sobre el endotelio<sup>228,229</sup>.

Un aspecto llamativo en todos estos modelos de nefropatía por CNIs, es que el estudio de los mecanismos inflamatorios, el papel de la inflamación y su progresión no han sido estudiados de forma específica. Se ha estudiado recientemente la evolución temporal de la nefrotoxicidad por CsA *in vivo*, aunque no se analizaron parámetros inflamatorios<sup>211</sup>. Previamente, se describió como la infiltración de macrófagos en el riñón es un proceso progresivo y precedente a la fibrosis intersticial, aunque sin aportar evidencias de una relación de causa y efecto entre ambos fenómenos. Otros estudios en modelos animales emplearon anticuerpos neutralizantes de IL-6 y TGF-  $\beta$ , resaltando el papel de ambas citoquinas en el desarrollo de la inflamación y la nefrotoxicidad por CsA en periodos crónicos<sup>219,225</sup>. También se sugirió un papel para la inmunidad innata a partir de la observación de la estimulación de la expresión de los receptores TLR2 y TLR4, así como mayor cantidad de células dendríticas en riñones de células tratadas de forma crónica con CsA<sup>220,222</sup>.



## **2. Hipótesis y Objetivos**



## Hipótesis

Los anticalcineurínicos tienen un efecto inmunosupresor sobre las células de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, la nefrotoxicidad parece depender de efectos directos sobre las células renales, fundamentalmente células tubulares y endoteliales. En este sentido, hipotetizamos que los anticalcineurínicos podrían tener efectos proinflamatorios directamente sobre células intrínsecas renales y que esta respuesta proinflamatoria podría contribuir a su nefrotoxicidad.

El stress del epitelio tubular renal o del endotelio puede desencadenar una respuesta proinflamatoria como parte de una lesión celular subletal. La respuesta inflamatoria, a su vez, amplifica el daño renal. Si bien los estudios sobre la nefrotoxicidad de los anticalcineurínicos se han centrado sobre todo en su capacidad para inducir muerte celular y en los mecanismos moleculares implicados, es probable que *in vivo* una lesión subletal sea más frecuente y los mecanismos implicados pueden diferir de los activados en la muerte celular. En este sentido, la generación de inflamación renal en respuesta a anticalcineurínicos podría contribuir a la propagación del daño y a la progresión de la nefropatía. Por lo tanto, la caracterización de los mecanismos moleculares de activación de la respuesta inflamatoria renal ocasionada por los anticalcineurínicos, podría identificar nuevas dianas terapéuticas para la prevención y/o tratamiento de la nefropatía asociada al su uso crónico.





## **Objetivos**

- 1- Caracterizar la respuesta inflamatoria inducida por anticalcineurínicos en células relevantes en la patología renal, epitelio tubular y endotelio.
- 2- Estudiar las vías de señalización intracelular responsables de la respuesta inflamatoria inducida por anticalcineurínicos.
- 3- Estudiar la relevancia in vivo de los mediadores y vías de señalización identificados en células cultivadas como mediadores de la respuesta inflamatoria inducida por anticalcineurínicos.
- 4- Implementar una terapia experimental de prevención o atenuación de la inflamación renal inducida por anticalcineurínicos.



### **3. Material y Métodos**



## 3.1. ESTUDIOS *IN VITRO*

### 3.1.1 Líneas Celulares

Se emplearon las siguientes líneas celulares: Las células MCT provienen del laboratorio del Dr Eric G. Nielson (Universidad de Vanderbilt, Nashville, TN) y fueron obtenidas mediante microdissección de túbulos proximales de ratones juveniles SJL (Haverty, TP; 1988, J Cell Biol107(4): 1359-1368). La línea celular MS1 fue adquirida comercialmente (ATCC®, referencia CRL-2279™). Esta línea fue obtenida a partir de un cultivo primario de la microvasculatura de los islotes de Langerhans de páncreas de ratón posteriormente transformado mediante un vector SV40 sensible a temperatura. Las células retienen múltiples características de las células endoteliales originales, incluidas la toma de LDLs acetiladas y expresión de ambos el antígeno relacionado con el Factor VIII de la coagulación y el receptor de VEGF.

Las células MCT se cultivaron en medio RPMI 1640 (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con un 10% de Suero Bovino Fetal (SBF, Lonza) decomplementado, 120 U/ml de Penicilina y 120 U/ml de Estreptomicina (mezcla de Penicilina y Estreptomicina de Lonza); y 2,8 mM de L-Glutamina (Lonza). La línea MS1 se cultivó en medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), con alta concentración (4,5 g/l) de Glucosa, suplementado con 5% de SBF, 120 U/ml de Penicilina y Estreptomicina y 4 mM de L-Glutamina. Ambos tipos celulares se cultivaron a 37°C y con una presión parcial de CO<sub>2</sub> del 5%.

### 3.1.2 Estímulos e inhibidores utilizados

La ciclosporina A (Calbiochem), aislada de *Tolipocladium inflatum*, se resuspendió a una concentración final de 10 mg/ml en etanol absoluto filtrado para esterilidad. El tacrolimus (Selleckchem) se resuspendió de la misma forma. El lipopolisacárido bacteriano (Sigma-Aldrich) fue resuspendido hasta una concentración de 1 mg/ml en agua desionizada esterilizada por autoclave y filtrada. El ácido lipoteicoico (Sigma-Aldrich) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (Prepotech, Rocky Hill, Nueva Jersey, EEUUA) fueron preparados de igual modo al LPS. El LPS y el LTA son comúnmente empleados como estímulos de control positivo para estudios de la respuesta pro-inflamatoria mediada por TLRs y TNFα para la mediada por NF-κB.

Los inhibidores y detalles de uso se listan en la **Tabla 1**.

### 3. Materiales y Métodos

| COMPUESTO                 | DIANA                    | [ ] CULTIVO   | [ ] SOLUCIÓN MADRE | DISOLVENTE        | PRODUCTOR              |
|---------------------------|--------------------------|---------------|--------------------|-------------------|------------------------|
| (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK1i) | TAK1                     | 5 $\mu$ M     | 28 mM              | DMSO <sup>1</sup> | Calbiochem             |
| AG490                     | JAK2                     | 50 $\mu$ M    | 50 mM              | DMSO              | Calbiochem             |
| Apocinina                 | NAD(P)H-Oxidasa.         | 10 mM         | 1 M                | DMSO + Etanol     | Sigma-Aldrich          |
| CLI-095/TAK-242           | TLR4                     | 10 $\mu$ g/ml | 1 mg/ml            | DMSO              | Invivogen <sup>2</sup> |
| CN585                     | Calcineurina             | 10 $\mu$ M    | 12 mM              | DMSO              | Calbiochem             |
| Difenilyodonio (DPI)      | NAD(P)H-Oxidasa          | 10 $\mu$ M    | 10 mM              | DMSO              | Sigma-Aldrich          |
| IRAK1/4i                  | IRAK1                    | 20 $\mu$ M    | 20 mM              | DMSO              | Calbiochem             |
| Parthenolide              | Eje NF- $\kappa$ B (IKK) | 10 $\mu$ M    | 100 mM             | DMSO              | Sigma-Aldrich          |
| pepInh MyD                | MyD88                    | 50 $\mu$ M    | 1 mM               | H <sub>2</sub> O  | Invivogen              |
| pepInh TRIF               | TRIF                     | 50 $\mu$ M    | 1 mM               | H <sub>2</sub> O  | Invivogen              |
| Resveratrol               | Vía TRIF                 | 50 $\mu$ M    | 50 mM              | DMSO              | Sigma-Aldrich          |
| SP600125                  | JNK                      | 25 $\mu$ M    | 50 mM              | DMSO              | Calbiochem             |

**Tabla 1.** Listado de inhibidores empleados y condiciones experimentales de uso en los experimentos.

El parthenolide es un inhibidor de la enzima I $\kappa$ B quinasa, que fosforila la proteína represora de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, marcandola para su procesamiento en el proteosoma; parthenolide bloquea efectivamente la señalización por las proteínas en el eje NF- $\kappa$ B y se ha usado en estudios en esta ruta. AG490 y SP600125 son inhibidores de la fosforilación de JAK2 y de JNK, respectivamente. El (5Z)-7-Oxozeaenol (TAK1i) es un compuesto de la familia de las lactonas inhibidor de la proteína quinasas TAK1; IRAK1i inhibidor es un potente inhibidor de IRAK1; pepInh TRIF y pepInh MyD son inhibidores peptídicos de las proteínas TRIF y MyD88, junto con el TAK1i y el IRAK1i, se emplearon para bloquear la señalización por TLRs por inhibición de complejos proximales de receptores TLR. CLI-095/TAK-242 es un inhibidor de TLR4 en su dominio intracelular que se usó para delimitar cuales de los TLRs se hallaban implicados en nuestros estudios. El CN585 es un inhibidor químico de CaN independiente de ciclofilinas e inmunofilinas que se empleó para comprobar los efectos del bloqueo de la CaN mediante otros medios que no fuesen nuestros estímulos de referencia.

Apocinina y DPI son inhibidores químicos de la NADH- y NADPH-Oxidasas empleados comúnmente para bloquear los efectos de la producción de ROS.

Se empleó también sulforaphane. Éste es un compuesto que estimula la actividad del factor de transcripción Nrf-2, muchas de cuyas dianas son promotores de genes de enzimas con función antioxidante; en cultivo se utilizó con una concentración de 20 $\mu$ M a partir de un stock 10 mM.

### **3.2. ESTUDIOS *IN VIVO***

#### **3.2.1. Diseños experimentales**

Los modelos experimentales en ratones se realizaron de acuerdo con la guía de los Servicios Nacionales de Salud de EE.UU para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication Nu 85-23, revised 1996) y con el consentimiento del Comité Ético del Centro.

##### **3.2.1.1. Modelo de nefrotoxicidad e inflamación en ratón *in vivo***

Se inyectó de forma subcutánea a los ratones ciclosporina (resuspendida en etanol absoluto y vehiculizada en aceite de oliva, todo ello filtrado para esterilidad) a 200mg/ml para una dosis efectiva en los ratones en torno a 250 mg/kg/día durante cinco, siete o diez días. Los animales en los grupos de control recibieron etanol absoluto filtrado para esterilidad vehiculado de la misma forma durante los mismos tiempos. Los animales fueron sacrificados al final de cada periodo.

##### **3.2.1.2. Modelo de nefrotoxicidad e inflamación intervenido mediante inhibidor del TLR4 en ratón *in vivo***

Se inyectó a dos grupos de ratones CLI-095/TAK-242 (resuspendido en DMSO y vehiculado en suero fisiológico estéril, todo ello filtrado para esterilidad) a una concentración final de 500 mg/ml para una dosis final efectiva de 3 mg/Kg/día. Una hora después, uno de los dos grupos recibió una inyección de ciclosporina comercial (Sandimmun<sup>®</sup> inyectable, vehiculizada en suero fisiológico estéril) para una dosis final de 50 mg/Kg/día y el otro grupo recibió vehículo. Un cuarto grupo recibió sólo el vehículo de la ciclosporina. Los cuatro grupos recibieron sus tratamientos correspondientes durante diez días, sacrificándose al final del periodo a todos los animales.

#### **3.2.2. Procesamiento de los tejidos**

Los ratones fueron anestesiados con isofluorano en el momento del sacrificio. Se canuló la aorta abdominal a la altura de la bifurcación y, tras abrir un orificio en la vena cava inferior y clampar la aorta a su entrada en el abdomen, los riñones fueron perfundidos con 50 ml de solución salina 0.9% a 4°C. A continuación se extrajeron los riñones, se descapsularon y

se dividieron en fragmentos aproximadamente iguales. Las muestras para inmunohistoquímica se sumergieron en solución de paraformaldehído al 4% en PBS y posteriormente se incluyeron en parafina. También se recogieron muestras de sangre y orina para la determinación de diversos parámetros (BUN, creatinina y urea) de todos ellos. Además, al menos dos mitades de riñón de cada ratón fueron congeladas en nitrógeno líquido para extracción de ARN mediante TriPure (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Alemania) o para estudios de proteínas a partir de extractos totales utilizando solución tamponada de TrisHCl, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 25 mM, Tritón X-100 0,2%, NP-40 0,3%, PMSF 0,1 mM suplementado con PhosSTOP (cóctel de inhibidores de fosfatasa; Roche Diagnostics GmbH) y CComplete (cóctel de inhibidor de proteasas; Roche Diagnostics GmbH)).

### 3.3. TÉCNICAS EMPLEADAS

#### 3.3.1. Ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA)

Para los estudios en células cultivadas, después de la incubación con los estímulos, fueron tripsinizadas y resuspendidas en 9 ml de PBS (pH 7). Se centrifugaron a baja velocidad (1000 rpm) y los pellets celulares se recogieron y lavaron en 1ml de PBS, centrifugándose de nuevo para descartar el PBS. Seguidamente, los extractos nucleares y citosólicos se obtuvieron mediante el kit de extracción NE-PER<sup>®</sup> según las instrucciones del fabricante (ThermoScientific). Para la cuantificación de proteína se empleo la técnica del BCA (ThermoScientific), detectando colorimétricamente la cantidad de proteína relativa a una curva patrón con BSA.

#### 3.3.1.2. Marcaje del oligonucleótido consenso y unión

El oligonucleótido consenso de NF- $\kappa$ B o AP-1 (Promega) se marcó con 10  $\mu$ Ci de [<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham) empleando 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega) durante 10 minutos en una reacción que contenía de Tris-HCl 70 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 5 mM. La reacción se paró añadiendo EDTA 0,5 M hasta una concentración final de 0,05 M. Se equilibraron 8  $\mu$ g de proteína nuclear durante 10 minutos en un tampón de unión (Tris-HCl 1mM pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, glicerol 4%, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM) en presencia de 50  $\mu$ g/ml de poli (dI-dC). A continuación las muestras se incubaron durante 20 min con 0,035 pmoles del oligonucleótido marcado en el mismo tampón. La reacción se paró añadiendo tampón de carga (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, azul de bromofenol 0,2%, xilen-cianol 0,2%, glicerol 2%). Los complejos proteína-DNA se separaron del exceso de sonda no unida en un gel no desnaturante de poliacrilamida al 4% en TBE 0,25% a 150 V. Una vez terminada la electroforesis los geles se secaron y expusieron para autorradiografía.



### 3.3.2. Western Blot

Las proteínas de tejido y células se extrajeron empleando una solución tampón compuesto por TrisHCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 25 mM, Tritón X-100 0,2%, NP-40 0,3%, PMSF 0,1 mM suplementado con PhosSTOP y C0mplete. Después de ser mezcladas con solución tampón de carga (LB 5X, Tris 1 M pH 6,8; Glicerol 30%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,4%, p/v DTT 7,6%) y desnaturalizadas durante 5 minutos a 95°C, las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida a distintos porcentajes (entre el 8 % y el 12 %) en condiciones desnaturalizantes y reductoras y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en Tris 25 mM, pH=8,3, glicina 150 mM, metanol 20%. Las membranas se bloquearon con TBS/Tween al 0,5 %/ leche desnatada 5% durante 1h y se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios de la tabla 2.

Después de lavar para eliminar el exceso de anticuerpo, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa o biotina. En el caso de las membranas con anticuerpos secundarios biotinilados, éstas fueron tratadas con el kit ABC Vectastain (Vector Laboratories, Burlingame, California, EEUUA) de estreptavidina-peroxidasa. Después de lavar para eliminar exceso de anticuerpo secundario y de reactivos del AB-complex, las bandas se revelaron mediante quimioluminiscencia con reactivo ECL (General Electric Healthcare) y películas de autoradiografía o mediante un LAS4000 (General Electric Bio-Sciences). La densidad óptica de las bandas se cuantificó mediante el software Quantity One (Bio-Rad) y se relativizó respecto a las proteínas empleadas como control de carga.

### 3. Materiales y Métodos

| Proteína diana del anticuerpo.                   | Dilución. | Resuspendido en TBS-T más... | Referencia | Casa Comercial         |
|--|-----------|------------------------------|------------|------------------------|
| Phospho-JAK2                                     | 1:1000    | BSA                          | #44426G    | Invitrogen             |
| Phospho-STAT3                                    | 1:1000    | BSA                          | #9131      | Cell Signaling         |
| Phospho-JNK                                      | 1:1000    | BSA                          | #4668      | Cell Signaling         |
| JNK  | 1:1000    | BSA                          | #9258      | Cell Signaling         |
| Phospho-NF- $\kappa$ B p65                       | 1:1000    | BSA                          | #3033      | Cell Signaling         |
| Phospho-I $\kappa$ B $\alpha$                    | 1:1000    | BSA                          | # 2859     | Cell Signaling         |
| MyD88  | 1:1000    | BSA                          | #4283      | Cell Signaling         |
| Phospho-TAK1                                     | 1:1000    | BSA                          | #4508      | Cell Signaling         |
| TAK1   | 1:1000    | BSA                          | #4505      | Cell Signaling         |
| Calcineurina<br>(pan A)                          | 1:1000    | BSA                          | #07-1491   | Millipore              |
| Phospho –IRF3 (pSer 936)                         | 1:1000    | BSA                          | #3661      | Sigma-Aldrich          |
| Nrf2   | 1:1000    | BSA                          | sc-10789   | Santa Cruz<br>Biotech. |
| Hemeoxigenasa 1                                  | 1:1000    | leche                        | sc-722     | Santa Cruz<br>Biotech. |
| Tubulina $\alpha$                                | 1:5000    | Leche                        | T5168      | Sigma-Aldrich          |
| Gliceraldehido-fosfato<br>Deshidrogenasa (GAPDH) | 1:5000    | Leche                        | CB1001     | Millipore              |
| $\beta$ -Actina                                  | 1:5000    | Leche                        | sc-47778   | Santa Cruz<br>Biotech. |
| Anticuerpo secundario                            | Dilución  | Fabricante                   | Referencia |                        |
| Anti-mouse HRP                                   | 1:5000    | General Electric             | 10196124   |                        |
| Anti-rabbit HRP                                  | 1:5000    | General Electric             | 10794347   |                        |
| Anti-mouse biotin                                | 1:5000    | Millipore Chemicon           | AP-124B    |                        |
| Anti-rabbit biotin                               | 1:5000    | Thermo Chemicon              | AP-132B    |                        |

**Tabla 2.** Listado de Anticuerpos empleados en Western Blot.

#### 3.3.3. PCR en tiempo real.

El ARN total de células o de tejido se extrajo siguiendo las instrucciones del protocolo del fabricante para el reactivo TriPure (Roche Diagnostics). Se cuantificó el ARN total en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 y se comprobó que el cociente entre las absorbancias a

260 y 280 nm era p xima a 2 , indicando la ausencia de contaminación por proteínas, y que el cociente entre absorbancia a 260 nm y absorbancia a 230 nm era superior a 1,8, lo que señala ausencia de contaminación por reactivos orgánicos como el fenol. La transcripción inversa se realizó empleando uno o dos microgramos de ARN utilizando el reactivo High Capacity cDNA Archive Kit (AppliedBiosystems).

| Número de Identificación | Gen                   | Organismo |
|--------------------------|-----------------------|-----------|
| Mm_00434228_m1           | IL-1                  | ratón     |
| Mm00438656_m1            | endotelina            | ratón     |
| Mm00439552_s1            | inf 1                 | ratón     |
| Mm00440338_m1            | MyD88                 | ratón     |
| Mm00441242_m1            | ccl2/MCP-1            | ratón     |
| Mm00443260_g1            | tnfa                  | ratón     |
| Mm00445235_m1            | cxcl10/IP-10          | ratón     |
| Mm00446190_m1            | Il-6                  | ratón     |
| Mm00506686_m1            | havcr1/kim-1          | rat n     |
| Mm00515153_m1            | ifit1                 | rat n     |
| Mm00516023_m1            | icam-1                | rat n     |
| Mm00516793_g1            | irf7                  | rat n     |
| Mm00849805_m1            | Hmgb1                 | rat n     |
| Mm01256734_m1            | Fibronectina          | rat n     |
| Mm01268754_m1            | ccl20                 | ratón     |
| Mm01288580_m1            | irf1                  | ratón     |
| Mm01302428_m1            | ccl5/Rantes           | ratón     |
| Mm01310197_m1            | e-selectina           | ratón     |
| Mm01317678_m1            | ppp3ca/calcineurina A | ratón     |
| Mm01320970_m1            | vcam-1                | ratón     |
| Mm99999915_g1            | gapdh                 | ratón     |
| Hs00234140_m1            | Ccl2/MCP-1            | Humano    |
| Hs99999905_m1            | GAPDH                 | Humano    |

**Tabla 3.** Listado de sondas de Real Time – qPCR.

La PCR en tiempo real se realizó mediante el sistema de PCR Prism 7500 (AppliedBiosystems) usando el método delta Ct. Las reacciones se prepararon usando la

### 3. Materiales y Métodos

Master Mix (Roche Diagnostics) que contiene el tampón, la polimerasa y los nucleótidos necesarios para la reacción, junto con la muestra y el cebador específico de cada gen diana. En la misma reacción (multiplexado) o como reacción aparte se añadieron cebadores para amplificar también el ARN del gen que codifica para el gen de la Glicer aldehído-fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) como control interno. Después de un periodo inicial de 2 minutos a 50°C y de 10 minutos 95°C, las muestras pasaron por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los resultados de la amplificación del gen de interés se normalizaron con los datos obtenidos de los transcritos controles. Las sondas prediseñadas se obtuvieron de Applied Biosystems (**tabla 3**).

#### 3.3.4. ELISA

Se emplearon diversos kits de ELISA (listados en la **tabla 4**) para determinar las concentraciones de distintas citoquinas y moléculas de adhesión en sobrenadantes de cultivos celulares. Cada muestra se cuantificó por triplicado y sus valores se expresaron en pg/ml, calibrándose cada ensayo mediante una curva patrón a partir de soluciones patrón s de concentración conocida.

Los kits de ELISA empleados fueron los siguientes:

| Citoquina/molécula       | Fabricante     |
|--------------------------|----------------|
| DuoSet mouse ICAM-1/CD54 | R&D Systems    |
| BD OptEIA mouse IL-6     | BD Biosciences |
| BD OptEIA mouse MCP-1    | BD Biosciences |

**Tabla 4.** Lista de kits de ELISA empleados.

Las muestras para los ensayos de MCP-1 y de IL-6 se diluyeron antes de ser cargadas en la placa. Los kits OptEIA emplearon en la solución de ensayo FBS mientras que los DuoSet se prepararon con un concentrado de BSA del mismo fabricante. Todos los ELISA se realizaron según el protocolo correspondiente proporcionado por sus fabricantes y las curvas patrón se ajustaron de forma logarítmica según recomendaciones del protocolo.

#### 3.3.5. Ensayos de silenciamiento de la expresión génica mediante siRNA

Se realizaron diversos experimentos usando ARNs de interferencia para suprimir la expresión de distintas proteínas en células endoteliales. El protocolo de preparación fue similar en todos los casos: 7.5 µl de lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen – Life technologies™) se diluyeron en 242,5 µl de medio OptiMEM (GIBCO – Life technologies) para dar lugar a la preparación A; por otra parte, un volumen determinado de siRNA para alcanzar una concentración efectiva de silenciamiento o de mezcla de siRNA “scramble” (según se indica en

la **tabla 5**) se diluyó también en medio OptiMEM hasta un volumen final de 250 µl, dando la preparación B. Ambas preparaciones se incubaron a temperatura ambiente durante cinco minutos y, seguidamente, se añadió la preparación A gota a gota sobre la preparación B y se dejó incubar nuevamente a temperatura ambiente la mezcla de transfección durante al menos 20 minutos. Entretanto, se sustituyó el medio de cultivo de las células endoteliales de una placa de seis pocillos en semiconfluencia (aproximadamente al 75% de confluencia) por 500 µl del medio OptiMEM. Una vez concluido el tiempo de incubación, se añadió la mezcla de transfección gota a gota sobre el medio en la placa. La mezcla de transfección se dejó 18 horas y fue sustituida por medio de cultivo completo (FBS 5%). Tras 6-8 horas, se reemplazó el medio completo por medio de depleción (FBS 0%) y se dejó durante al menos otras 24 horas, después de las que se sustituyó el medio por medio de depleción fresco y se inocularon los estímulos en el medio de cultivo (CsA, Tac, LPS o LTA, según el caso). Los sobrenadantes y las células (en solución tamponada de proteínas para Western Blot) se recuperaron a las 24 horas de la estimulación y se congelaron a -80°C. Los sobrenadantes se procesaron mediante kits de ELISA para la valoración de las distintas proteínas y los extractos celulares fueron utilizados para identificar las proteínas de interés mediante Western blot.

Los siRNAs que se emplearon para los silenciamientos se detallan como sigue:

| Proteína diana del siRNA | Concentración efectiva     | Fabricante                | Referencia |
|--------------------------|----------------------------|---------------------------|------------|
| Calcineurina A (CaNA)    | 100 nM                     | Ambion- Life technologies | S72075     |
| MyD88                    | 50nM                       | Ambion- Life technologies | S201719    |
| Control/"Scramble"       | La misma que el específico | Ambion- Life technologies | #4390843   |

**Tabla 5.** Lista de siRNAs empleados en los silenciamientos de expresión de proteínas.

### 3.3.6. Ensayos de inmunofluorescencia

Las células epiteliales o endoteliales se cultivaron sobre discos de vidrio estériles adaptables a placas de cultivo de 24 pocillos (20.000 células por pocillo). Las células se trataron con estímulos e inhibidores como en otros experimentos similares. Todas las incubaciones con anticuerpos y los pasos de lavados se realizaron en agitación suave. Al finalizar el tiempo del experimento, las células se lavaron con PBS pH 7,0, se fijaron 25 minutos con paraformaldehído 4% en PBS y luego se lavaron con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno). Finalmente, las células se lavaron con Glicina 5%/PBS durante 10 minutos para retirar los restos de formaldehído y luego con PBS durante 5 minutos. Después de la fijación, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0,2%/PBS (5-10 minutos) y luego se lavaron tres veces con PBS (5 minutos cada lavado). Tras el paso de permeabilización, los discos se

### 3. Materiales y Métodos

bloquearon con una solución de PBS conteniendo 4% de BSA y 10% de suero de la especie en que se produjo el anticuerpo secundario, durante una hora a temperatura ambiente. Al término del bloqueo, se lavaron tres veces con BSA 1%/PBS (3 lavados de 5 minutos) y luego incubadas durante 18 horas a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de BSA 1%/4% de suero de oveja/PBS. El anticuerpo primario se lavó con BSA 1%/PBS (3 lavados de 5 minutos) y seguidamente se procedió a incubar los discos con el anticuerpo secundario fluorescente resuspendido en BSA 1%/PBS durante una hora, a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizaron tres lavados en oscuridad, de 5 minutos cada uno, con BSA 1%/PBS y luego las preparaciones se incubaron con solución de yoduro de propidio (Sigma) con RNasa A (Sigma) (concentraciones finales 1,25 mg/ml de yoduro y 5 µg/ml en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con BSA 1%/PBS (3 lavados de 5 minutos) y los discos se montaron con mowiol como agente protector de fluorescencia. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se indican en la **tabla 6**).

| Anticuerpo primario          | Dilución | Fabricante          | Referencia |
|------------------------------|----------|---------------------|------------|
| NF-κB p65                    | 1:200    | Santa Cruz Biotech. | sc-372     |
| pSTAT3                       | 1:100    | Cell Signalling     | #9131      |
| Anticuerpo secundario        | Dilución | Fabricante          | Referencia |
| ALEXA 488 anti IgG de conejo | 1:200    | Invitrogen          | A-11034    |
| ALEXA 488 anti IgG de ratón  | 1:200    | Invitrogen          | A-11001    |

**Tabla 6.** Lista de anticuerpos primarios y secundarios empleados en inmunofluorescencia.

#### 3.3.7. Ensayo de Especies Reactivas de Oxígeno con dihidroetidio (DHE)

Se cultivaron 20.000 células endoteliales sobre discos de vidrio estériles. El día previo a los experimentos, se cambió el medio de cultivo completo con por medio de depleción sin FBS ni rojo fenol. Las células se trataron con los estímulos apropiados como en otros experimentos similares y 30 minutos antes de retirar el experimento, se añadió el DHE a una concentración final de 10 µM desde un stock 5 mM, manteniendo las células en el incubador de cultivo. Al terminar los 30 minutos, con todos los pasos en oscuridad y con agitación suave, se procesaron los discos: las células fueron fijadas 20 minutos con paraformaldehído 4%/PBS, lavándolas después en tres pasos sucesivos con PBS (5 minutos), 5% p/v Glicina PBS (10 minutos) y PBS (5 minutos). Tras la fijación, en oscuridad, se añadió 4',6-Diamidino-2-fenilindol dilactato (DAPI-dilactato, Sigma-Aldrich) a una concentración 1:10.000 durante 30 minutos a temperatura ambiente para contrastar núcleos y después se lavó con PBS tres

veces (5 minutos por cada lavado). Los discos se montaron sobre portaobjetos utilizando mowiol.

### **3.3.8. Tinciones inmunohistoquímicas**

Las secciones de tejidos (riñones) incluidos en parafina se cortaron con un espesor de 2  $\mu\text{m}$ , se desparafinaron durante al menos una hora a 60°C y se realizó la recuperación antigénica utilizando el sistema PT Link (Dako Diagnostics, Barcelona, España) con tampón citrato sódico 10 mM ajustado a pH 6 o 10 según la proteína a detectar. Tras la recuperación antigénica, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando entre 20 y 30 minutos los cortes con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3% en metanol (1:1). Los cortes se lavaron con PBS y después se bloquearon en PBS con 4% de BSA y 8% de suero de la especie en que se produjo el anticuerpo secundario. A continuación, se lavaron los cortes nuevamente y se incubaron durante 18 horas a 4°C con los anticuerpos primarios resuspendidos en PBS con 2% de BSA y 4% de suero. Tras la incubación, se lavaron en BSA 4%/ PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con biotina o con HRP (General Electric Healthcare) durante una hora a temperatura ambiente. Los cortes tratados con biotina fueron lavados y se trataron con el kit Vectastain Vectastain (Vector Laboratories) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidina, DAKO): 3% peróxido de hidrógeno (130:1) durante tiempos variables entre 5 y 10 minutos. Por último se aplicó como contraste de fondo a todos los cortes una tinción con hematoxilina de Carazzi (Bio-Optica, Milán, Italia), se deshidrataron y se montaron en DPX (Fisher). Los correspondientes controles negativos se incubaron sin el anticuerpo primario. Dependiendo del marcaje, el número total de túbulos o células teñidas se contaron en 10 campos escogidos al azar (200 aumentos de magnificación) y se expresó el resultado como media  $\pm$  desviación típica de túbulos o células positivas por cada campo. Todos los anticuerpos se indican en la **tabla 7**.

### **3.3.9. Tinción tricrómica de Masson**

Las secciones de tejidos (riñones) incluidos en parafina se cortaron con un espesor de 2  $\mu\text{m}$ , se desparafinaron durante al menos una hora a 60°C y se sumergieron en xilol durante 5 minutos para completar el proceso. Los cortes se rehidrataron pasándolos por etanol absoluto, etanol 96% y etanol 70% en pasos de 3 minutos cada uno. Después se mantuvieron en agua destilada 3 minutos y se añadió la solución de hematoxilina de Weigert durante 7 minutos. Los cortes se lavaron con agua corriente durante 7 minutos y se añadió el primer mordiente (ácido pícrico) durante 5 minutos. Se lavó el mordiente con agua corriente hasta decoloración completa, después se añadió la fucsina de Ponceau, que se lavó con agua corriente como en el paso anterior, para añadir a continuación el segundo mordiente (ácido

### 3. Materiales y Métodos

---

fosfomolíbdico) durante 2 minutos. Se lavó el segundo mordiente como en los pasos precedentes y se añadió la tinción verde luz durante 10 minutos. Tras la última tinción, se lavaron los cortes con agua corriente y se procedió a deshidratar la preparación a través de pasajes por etanol 70% (3 mins.), etanol 96% (3 mins.), etanol absoluto (3 mins.) y xilol (5 mins), tras lo que se realizó su montaje final con DPX.

| Anticuerpo primario   | Dilución | Fabricante          | Referencia |
|-----------------------|----------|---------------------|------------|
| Caspasa-3             | 1:2500   | Promega             | G7481      |
| NF-κB p65             | 1:500    | Santa Cruz biotech. | scSc-372   |
| STAT3                 | 1:500    | Cell Signalling     | #8768      |
| F4/80                 | 1:10.000 | Bio-Rad             | MCA-497    |
| Anticuerpo secundario | Dilución | Fabricante          | Referencia |
| anti-IgG de rata      | 1:200    | DAKO                | E0468      |
| anti-IgG de ratón     | 1:200    | Thermo Chemicon     | AP-124B    |

**Tabla 7.** Listado de anticuerpos primarios y secundarios empleados en las inmunohistoquímicas de secciones renales.

#### 3.4. Análisis estadístico de los resultados

Los resultados de los experimentos se analizaron estadísticamente mediante el programa SPSS 12.0. Los resultados se analizaron mediante el test paramétrico de t de Student y con el test no paramétrico de Mann-Whitney, expresándose como la media aritmética  $\pm$  ESM. Para la validación estadística de los resultados se estableció una  $p < 0,05$ . Los ensayos in vitro fueron replicados al menos 3 veces en diferentes días.



## 4. Resultados

### 3. Materiales y Métodos

---

## **I. ESTUDIOS DE MECANISMOS Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PROINFLAMATORIAS INDUCIDAS POR LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA CICLOSPORINA A Y TACROLIMUS EN CÉLULAS TUBULARES RENALES**

### **4.1. Análisis transcriptómico de genes inflamatorios inducidos por ciclosporina A y tacrolimus en células tubulares murinas**

A fin de evaluar el potencial de los CNIs para iniciar respuestas inflamatorias en células tubulares renales y buscar moléculas relevantes que puedan contribuir a la inflamación dependiente de CNIs, se analizó el transcriptoma de células tubulares proximales renales murinas MCT tratadas con 10 µg/ml de CsA o 20 µg/ml de Tac durante 6 horas (**tabla 8**). Esta respuesta comprendió la expresión incrementada de: subunidades de NF-κB (Relb, Nfkb1/p50 y Nfkb2/p52), miembros de la familia IκB (Nfkbia y Nfkbie) y reguladores de NF-κB (Bcl 3, Rhebl1 y Tnfaip3). Además, se evidenciaron incrementos de la expresión de una serie de genes proinflamatorios dependientes de NF-κB. Estos incluyeron las quimioquinas Ccl2 (MCP-1), Ccl20 (MIP-3α), Ccl5 (Rantes), entre las que exhibieron los mayores incrementos; y otras como Cxcl10, Ccl7 y Cxcl11, con menores incrementos pero aún significativos. Otros genes dependientes de NF-κB con expresión incrementada se relacionaron con respuestas de la inmunidad innata, tales como Vcam1 e Icam1, Ilrn y Traf1.

La actividad transcripcional de NF-κB es regulada de forma precisa por cooperación con factores de transcripción asociados. El complejo NF-κB/proteína activadora-1 (AP-1) regula la transcripción de genes inflamatorios. Algunos de los miembros de las subfamilias de AP-1, concretamente Atf3, Maff, Fosl1, Junb, Mafk y Fos, también mostraron una expresión significativamente aumentada. Los CNIs también indujeron la expresión de citoquinas y factores pro-inflamatorios que comprendía, entre otros, Csf1, Il15ra, Il17ra y Ptgs2.

## 4. Resultados

**Tabla 8.**

Análisis transcriptómico de células tubulares en cultivo estimuladas por 6 horas con CsA o Tac.

Se muestra un listado de genes con reconocida función en inflamación .

| Función del gen/categoría                       | Símbolo del gen | CsA <sup>a</sup> | FDR CsA <sup>b</sup> | TAC <sup>a</sup> | FDR TAC <sup>b</sup> |
|---|-----------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| <i>Vía de señalización de NF-κB</i>             | <i>Bcl3</i> *   | 2,5              | 0,001                | 2,4              | 0,001                |
|   | <i>Nfkbie</i> * | 2,5              | 0,012                | 2,2              | 0,022                |
|   | <i>Relb</i> *   | 2,3              | 0,004                | 2,3              | 0,003                |
|   | <i>Tnfaip3</i>  | 2,0              | 0,022                | 1,3              | n.s.                 |
|   | <i>Nfkb2</i> *  | 1,9              | 0,007                | 2,0              | 0,003                |
|   | <i>Nfkb1</i> *  | 1,8              | 0,011                | 1,7              | 0,013                |
|   | <i>Nfkbia</i> * | 1,8              | 0,027                | 1,4              | n.s.                 |
|   | <i>Camk1d</i>   | 1,7              | 0,247                | 2,7              | 0,025                |
|   | <i>Rhebl1</i>   | 1,5              | 0,054                | 1,8              | 0,007                |
| <i>Dianas de NF-κB</i>                          | <i>Myc</i>      | 4,1              | >0.001               | 3,9              | >0.001               |
|   | <i>Vcam1</i>    | 3,1              | 0,001                | 3,4              | 0,001                |
|   | <i>Csf2</i>     | 2,9              | 0,007                | 2,2              | 0,030                |
|   | <i>Il1rn</i>    | 2,5              | 0,001                | 3,4              | >0.001               |
|   | <i>Traf1</i>    | 2,3              | 0,041                | 2,0              | n.s.                 |
|   | <i>Csf1</i>     | 1,8              | 0,003                | 1,7              | 0,004                |
|   | <i>Icam1</i>    | 1,4              | n.s.                 | 1,7              | 0,022                |
| <i>Citoquinas y mediadores proinflamatorios</i> | <i>Ccl20</i> *  | 20,5             | 0,013                | 13,5             | 0,020                |
|   | <i>Ccl2</i> *   | 10,6             | 0,002                | 11,6             | 0,002                |
|   | <i>Ccl5</i> *   | 6,8              | >0.001               | 15,3             | >0.001               |
|   | <i>Lif</i>      | 4,2              | >0.001               | 3,2              | >0.001               |
|   | <i>Ptgs2</i> *  | 4,1              | >0.001               | 3,8              | >0.001               |
|   | <i>Cxcl10</i> * | 4,0              | 0,009                | 4,6              | 0,004                |
|   | <i>Ccl7</i> *   | 3,6              | 0,017                | 4,7              | 0,004                |
|   | <i>Ccl2</i> *   | 2,8              | 0,006                | 3,5              | 0,002                |
|   | <i>Il15ra</i> * | 2,3              | 0,039                | 2,5              | 0,025                |
|   | <i>Cxcl11</i> * | 2,0              | n.s.                 | 2,8              | 0,013                |
|   | <i>Serpinb9</i> | 1,8              | 0,005                | 2,6              | >0.001               |
|   | <i>Il17ra</i>   | 1,8              | 0,044                | 1,9              | 0,018                |
|   | <i>Csf1</i>     | 1,8              | 0,003                | 1,7              | 0,004                |
|   | <i>Camk1d</i>   | 1,7              | n.s.                 | 2,7              | 0,025                |
|   | <i>Cd74</i>     | 1,7              | 0,010                | 2,2              | 0,001                |
| <i>Proteínas dependientes de AP-1</i>           | <i>Maff</i>     | 4,5              | 0,002                | 3,7              | 0,003                |
|   | <i>Fosl1</i>    | 3,6              | 0,024                | 3,4              | 0,027                |
|   | <i>Junb</i> *   | 2,8              | >0.001               | 2,0              | 0,002                |
|   | <i>Mafk</i> *   | 1,7              | n.s.                 | 1,9              | 0,029                |
|   | <i>Fos</i>      | 1,9              | 0,008                | 1,6              | 0,031                |

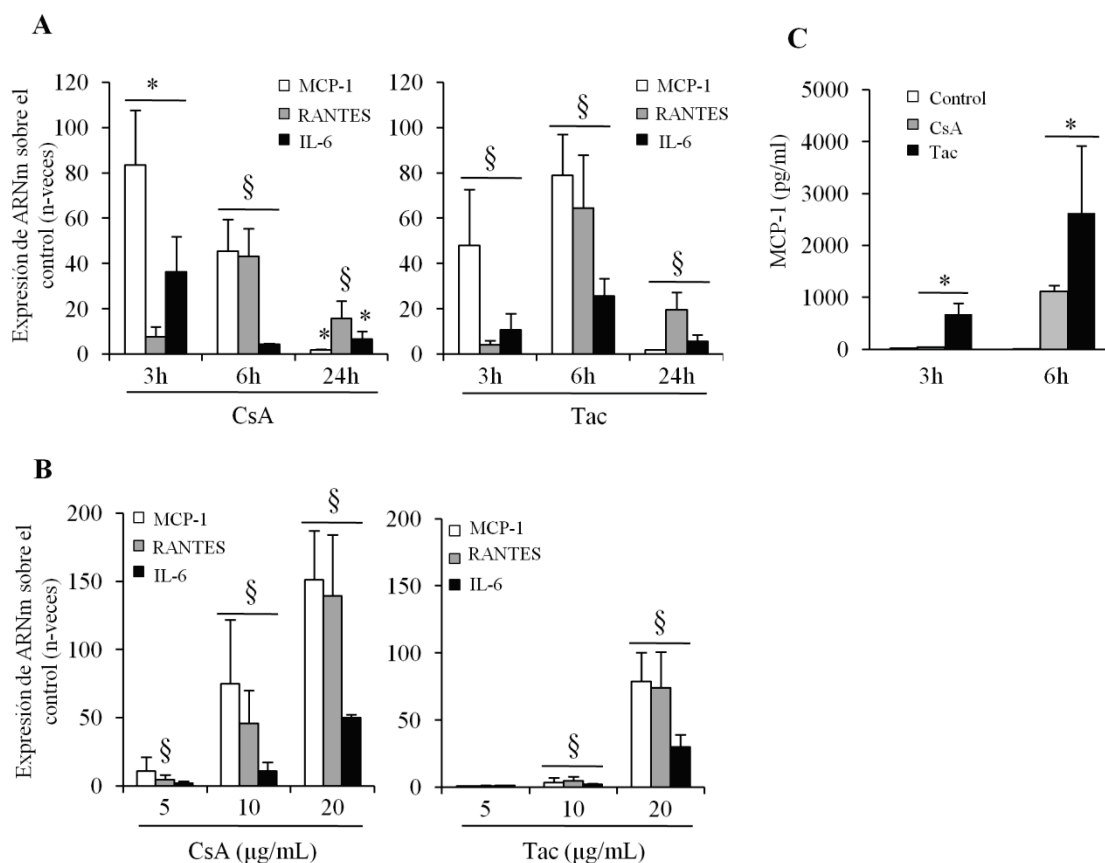
<sup>a</sup> Tasa de expresión de genes relativa al control (n veces)

<sup>b</sup> FDR (false discovery rate) en valores de p normalizados

\* Indica regulación por *NF-κB* n.s. no significativo

## 4.2. Los inhibidores de calcineurina desencadenan una respuesta inflamatoria rápida en células tubulares renales murinas en cultivo

Los mecanismos moleculares y de progresión temporal de la inflamación renal inducida por los CNIs son poco conocidos. En células murinas MCT, CsA y Tac provocaron incrementos transcripcionales dependientes de la dosis y del tiempo de reconocidos genes diana de la vía canónica de NF- $\kappa$ B, como son las quimioquinas MCP-1 y Rantes y la citoquina IL-6 (**figuras 8A y 8B**). Ambas quimioquinas e IL-6 alcanzaron su máxima expresión entre 3-6 horas para ambos estímulos y retornaron a valores próximos al control en torno a las 24 horas, excepto Rantes, que permaneció sobreexpresada a este tiempo (alrededor de 20 veces sobre el valor del control).



**Figura 8.** Los CNIs inducen la expresión de mediadores inflamatorios en células tubulares renales murinas MCT. El tratamiento con CsA o Tac induce la expresión de los genes de MCP-1, RANTES e IL-6 de manera dependiente del tiempo (**panel A**) y de la dosis (**panel B**). La proteína MCP-1 se expresa frente a CsA y Tac de forma dependiente del tiempo (**panel C**). (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. medidas por RT-qPCR de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control y § indica  $p < 0,02$  respecto al control)

Además, la síntesis de mRNA de citoquinas inducida por los CNIs se corroboró a nivel de proteína, tal como muestra la concentración incrementada de MCP-1 en sobrenadantes de los cultivos (**figura 8C**). Teniendo en cuenta éstos y otros resultados previos<sup>232</sup>, escogimos 10

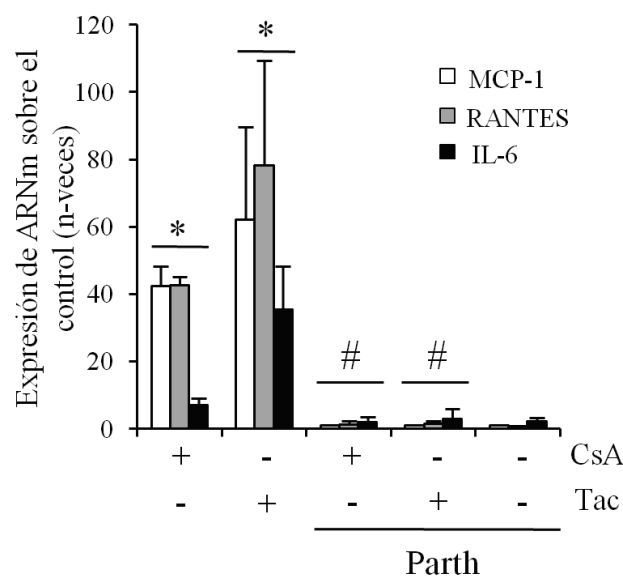
## 4. Resultados

$\mu\text{g/ml}$  de CsA y  $20 \mu\text{g/ml}$  de Tac y un tiempo de 6 horas, como condiciones estándares para el estudio de los mecanismos que conducen a la respuesta inflamatoria en células tubulares.

Como conclusión, junto con los estudios transcriptómicos, estos resultados indicaban que en las células tubulares renales murinas, los CNIs inducen una respuesta inflamatoria rápida y específica. Seguidamente, investigamos la regulación molecular de este efecto.

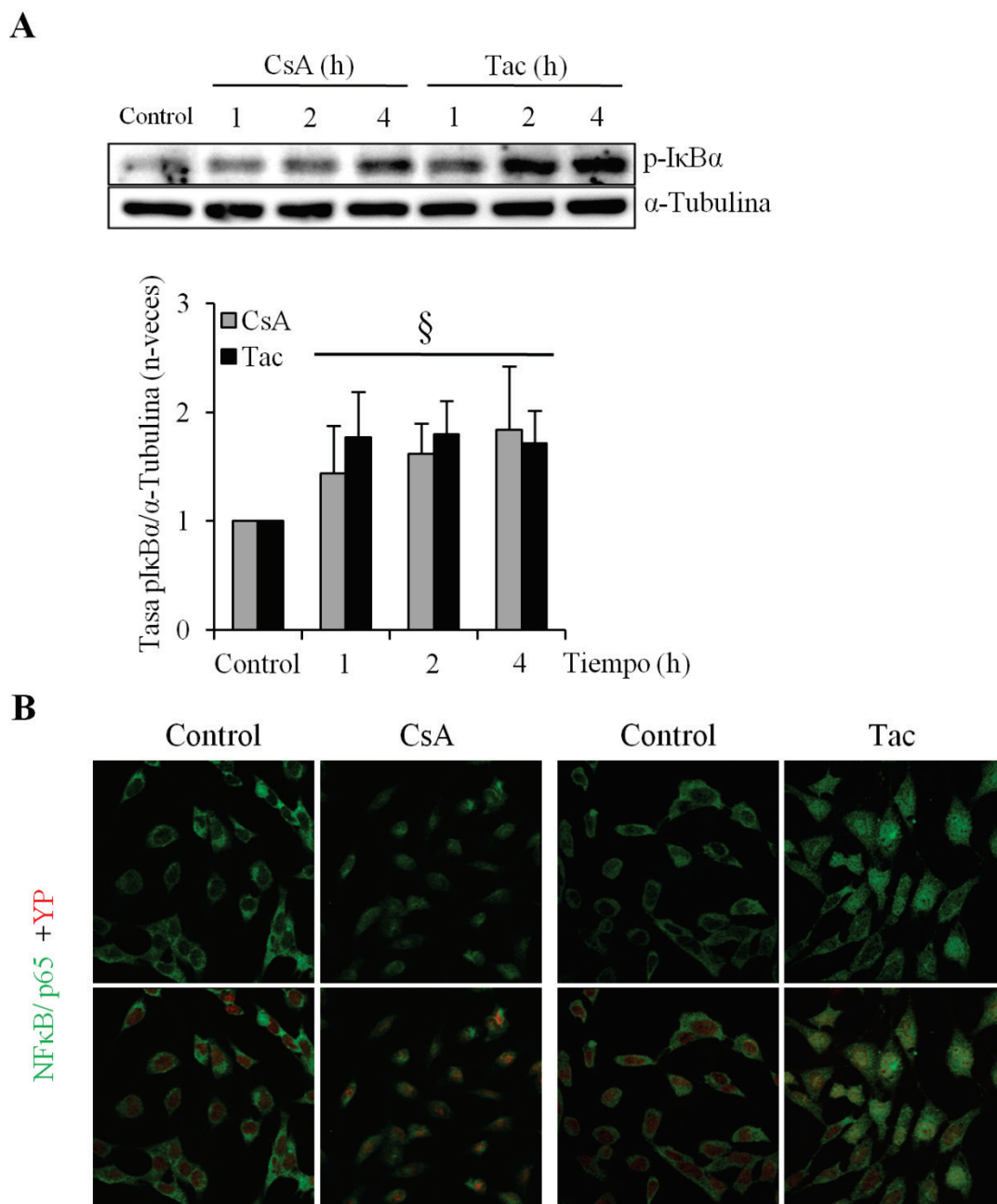
### 4.3. La síntesis de citoquinas proinflamatoria inducida por los inhibidores de calcineurina en células tubulares implica la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1 y STAT3

Los resultados de los arrays genómicos y la confirmación por PCR del aumento transcripcional de algunos de los genes de interés, sugerían la participación de NF- $\kappa$ B como mediador de estas respuestas. Para confirmar esta sospecha, las células MCT se trataron con el inhibidor de la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$ , parthenolide, en presencia o ausencia de los CNI. Se observó que el pretratamiento con parthenolide previno la respuesta inflamatoria iniciada por ambos CNIs, agregando una evidencia experimental adicional que sugería la regulación por NF- $\kappa$ B (**fig. 9**).



**Figura 9.** Efecto del inhibidor partenolide sobre la expresión génica a 6 horas de mediadores proinflamatorios inducida por CsA y Tac. (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes medidas por RT-qPCR. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control y # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente)

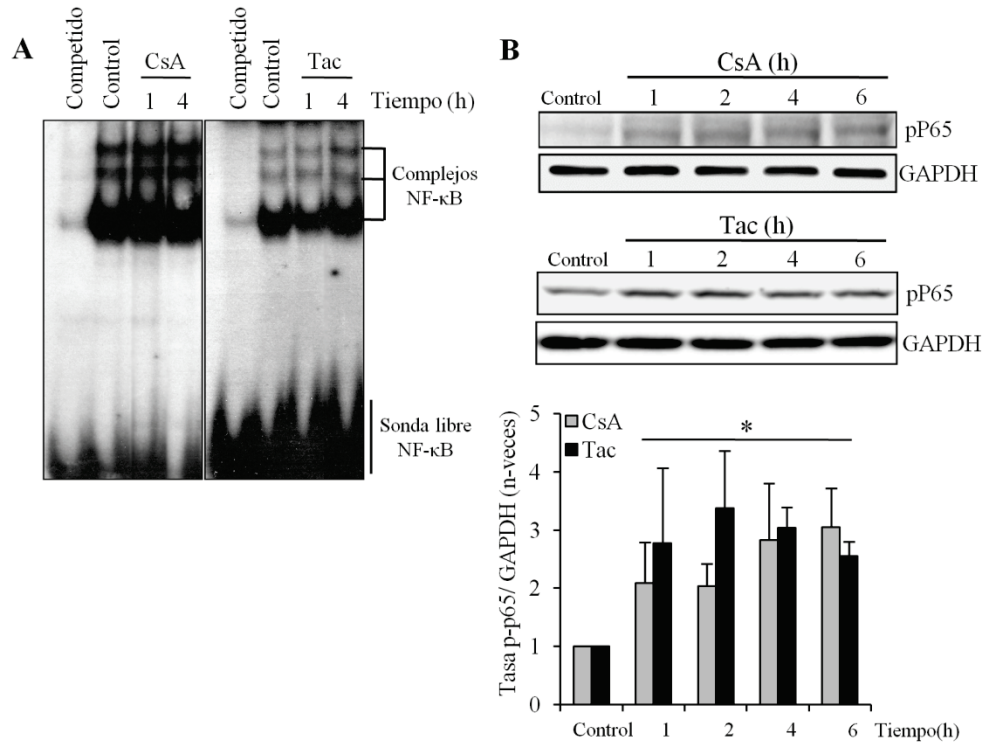
Además, se observó que los tratamientos con CsA y Tac inducían la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B mediante fosforilación/activación de I $\kappa$ B $\alpha$  (**fig. 10A**), seguidos de la translocación nuclear de la subunidad RelA/p65 de NF- $\kappa$ B (**fig. 10B**).



**Figura 10. A:** Western blot representativo de incremento de fosforilación de IκBα en función del tiempo para CsA y Tac e histograma de cuantificación (los datos corresponden a media ± desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control). **B:** inmunofluorescencia por microscopía confocal representativa de internalización en núcleo de p65 (verde: p65, rojo: yoduro de propidio. Magnificación original x400).

Además, CsA y Tac incrementaron la actividad de unión al ADN de NF-κB (**fig. 11A**). Una vez unido al ADN, NF-κB necesita múltiples pasos para la activación completa de la expresión génica, Así, la fosforilación de RelA/p65 en la Serina 536 estabiliza la unión al ADN de NF-κB RelA/p65 y permite la transcripción de un subconjunto de genes inflamatorios. En este sentido, CsA y Tac indujeron una fosforilación continuada de RelA/p65 en la Ser536 a lo largo del tiempo (**fig. 11B**).

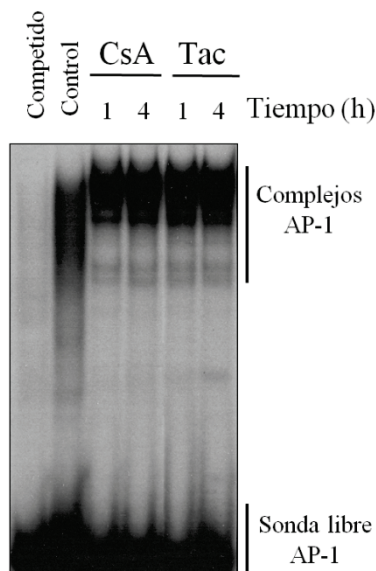
#### 4. Resultados



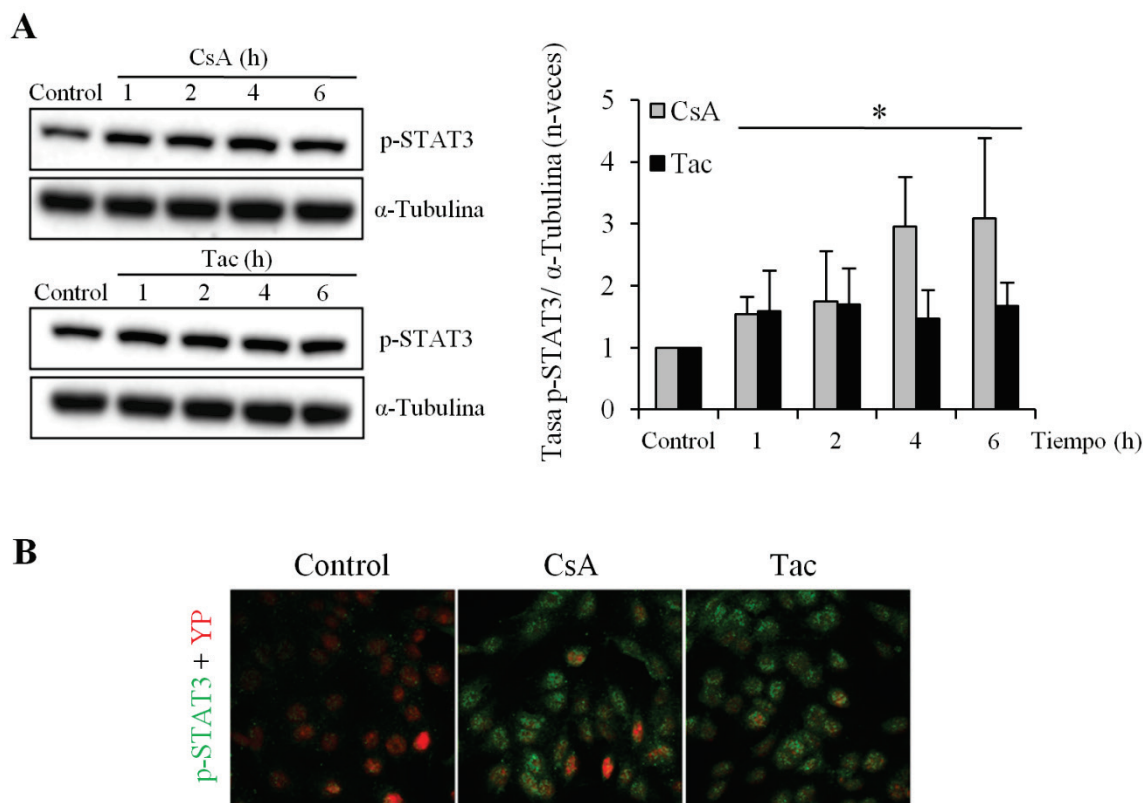
**Figura 11. A:** EMSA representativo de la unión al ADN de NF-κB en células MCTs tratadas con CsA y Tac a diferentes tiempos. **B:** western blot representativo de fosforilación/activación de NF-κB p65 por CsA y Tac en función del tiempo e histograma de cuantificación. (Los datos corresponden a media ± desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica p<0,05 respecto al control)

El NF-κB activado, además, puede interactuar y cooperar para modular la expresión de genes con otros factores de transcripción. En nuestro sistema experimental, los tratamientos con CsA y Tac condujeron a la activación de los factores de transcripción AP-1 y STAT3, evaluada como incremento en la unión a ADN de AP-1 (**fig. 12**) y de la fosforilación (**fig. 13A**) y translocación nuclear de STAT3 (**fig. 13B**).

**Figura 12.** EMSA representativo de la unión al ADN de NF-κB en células MCTs tratadas con CsA y Tac a diferentes tiempos.





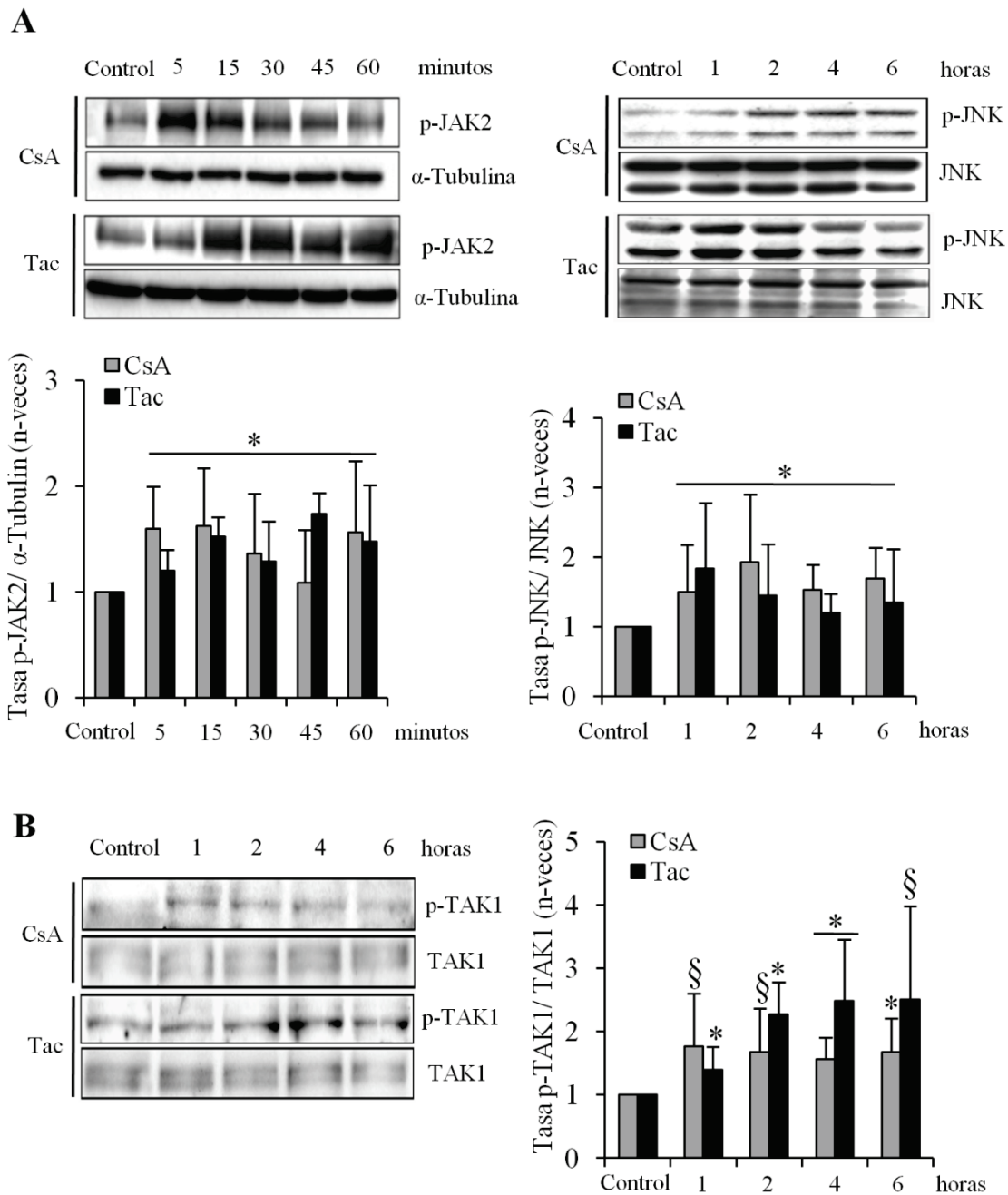


**Figura 13. A:** western blot representativo del incremento de fosforilación de STAT3 por CsA y Tac en función del tiempo y su histograma de cuantificación. (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control). **B:** translocación al núcleo de p-STAT3 contramarcados con yoduro de propidio (imágenes de confocal representativas; magnificación original x400).

#### 4.4. La síntesis de citoquinas proinflamatorias y la activación de NF- $\kappa$ B por ciclosporina y tacrolimus está mediada por las proteínas quinasas JAK2 y JNK

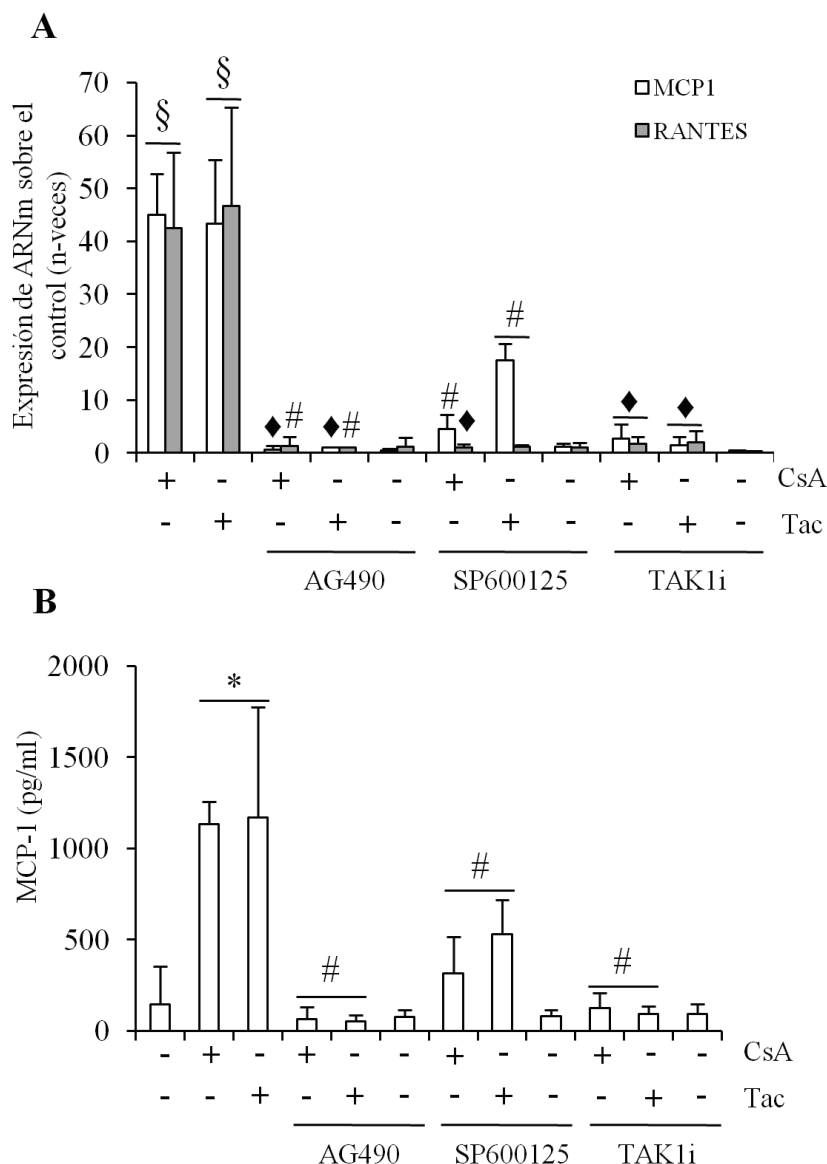
Múltiples rutas de señalización pueden converger para activar NF- $\kappa$ B. Se observó previamente que CsA activa la ruta JAK2/STAT3 para promover la citotoxicidad en las células tubulares renales y que JAK2/STAT3 media en la respuesta inflamatoria frente a citoquinas de las células tubulares<sup>214</sup>. Las quinasas TAK1 y JNK son dos quinasas relacionadas que también pueden mediar en la inflamación<sup>233,234</sup>. En los tratamientos de células MCT, tanto CsA como Tac indujeron la fosforilación/activación de JAK2, TAK1 y JNK (**figs. 14A y 14 B**). La activación de JAK2 se observó tan pronto como a los 5 minutos de tratamiento con ambos CNIs, mientras que la activación de JNK y de TAK1 se detectó a partir de 1 hora. La magnitud de estas respuestas fue similar con ambos CNIs.

#### 4. Resultados



**Figura 14.** Cinéticas de fosforilación de JAK2 y JNK (A) y de TAK1 (B) inducidas por CsA y Tac, evaluada mediante western blot. (Las imágenes corresponden a un western blot representativo de la serie experimental y los datos a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control y § indica  $p < 0,02$  respecto al control)

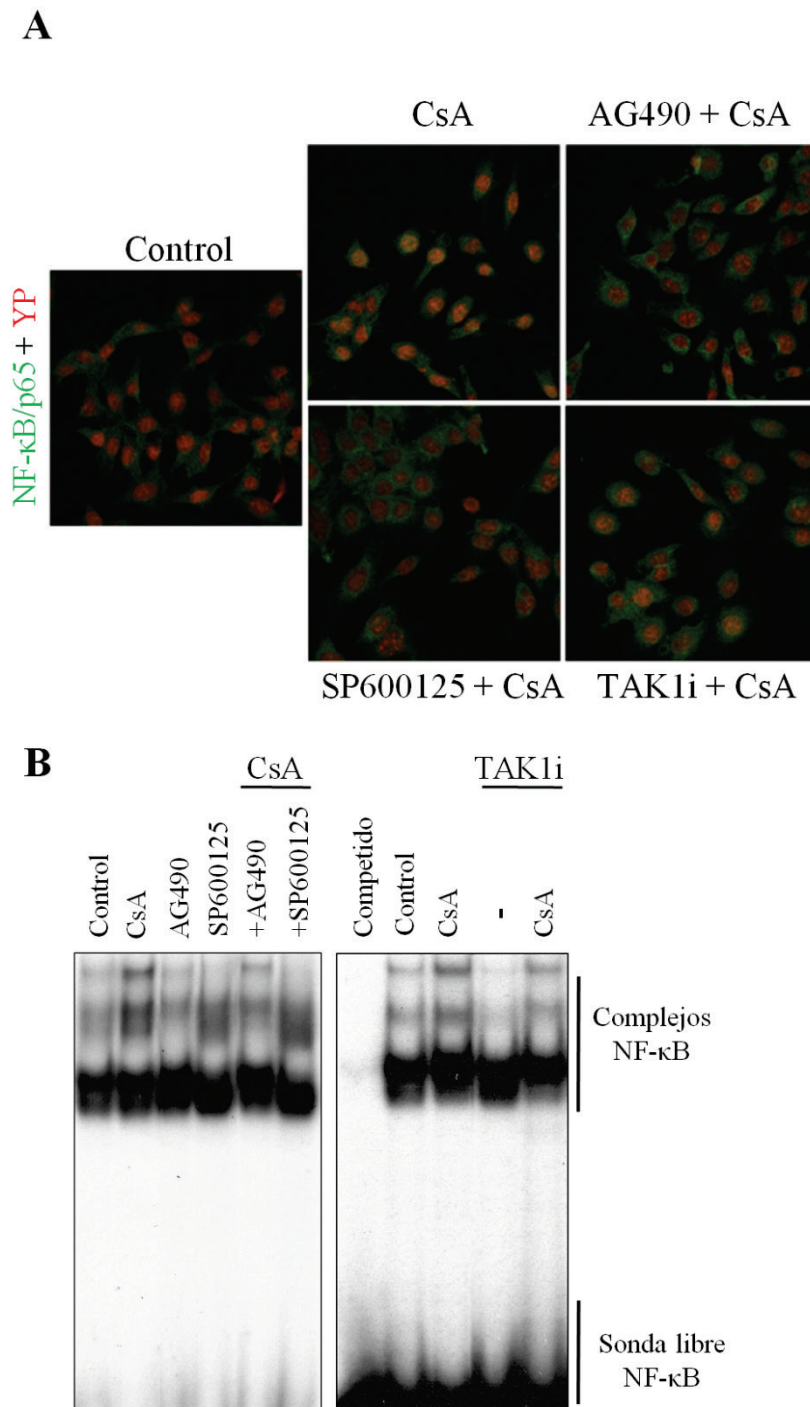
Además, la inhibición química de JAK2 con AG490 y de TAK1 con (5Z)-7-Oxozeanol evitó la síntesis génica de MCP-1 y Rantes inducida por los CNIs, mientras que la inhibición de JNK con SP600125 la redujo significativamente (**fig. 15A**). Asimismo, la inhibición de la síntesis proteica de MCP-1 se comprobó en los sobrenadantes de los cultivos celulares tratados con los tres inhibidores (**fig. 15B**).



**Figura 15. A:** Expresión de mRNA de MCP-1 y RANTES medido por q-RT-PCR en tratamientos con CsA y Tac a 6 horas con y sin el agregado de inhibidores de JAK2 (AG490), JNK (SP600125) y de TAK1 (TAK1i) (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente). **B:** Expresión de MCP-1 medida mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo procedentes de los tratamientos realizados en A (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control y # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente).

Finalmente, en tratamientos con CsA, los inhibidores de quinasas redujeron la translocación nuclear de p65 (**fig. 16A**) y su unión al ADN (**fig. 16B**).

En conclusión, el conjunto de los resultados presentados en este apartado, confirmaron la participación de JAK2, JNK y TAK1 como mediadores de las respuestas proinflamatorias desencadenadas por los CNIs en células tubulares renales.



**Figura 16. A:** inmunofluorescencia de internalización de NF- $\kappa$ B/p65 en tratamientos de combinación de CsA e inhibidores de JAK2 (AG490), JNK (SP600125) y TAK1 (TAK1i) (imágenes de microscopía confocal representativas; magnificación original x400). **B:** EMSA representativo con sonda NF- $\kappa$ B de muestras tratadas con CsA e inhibidores de JAK2, JNK y TAK1.

#### 4.5. Los inhibidores de calcineurina activan el receptor TLR4 en células tubulares

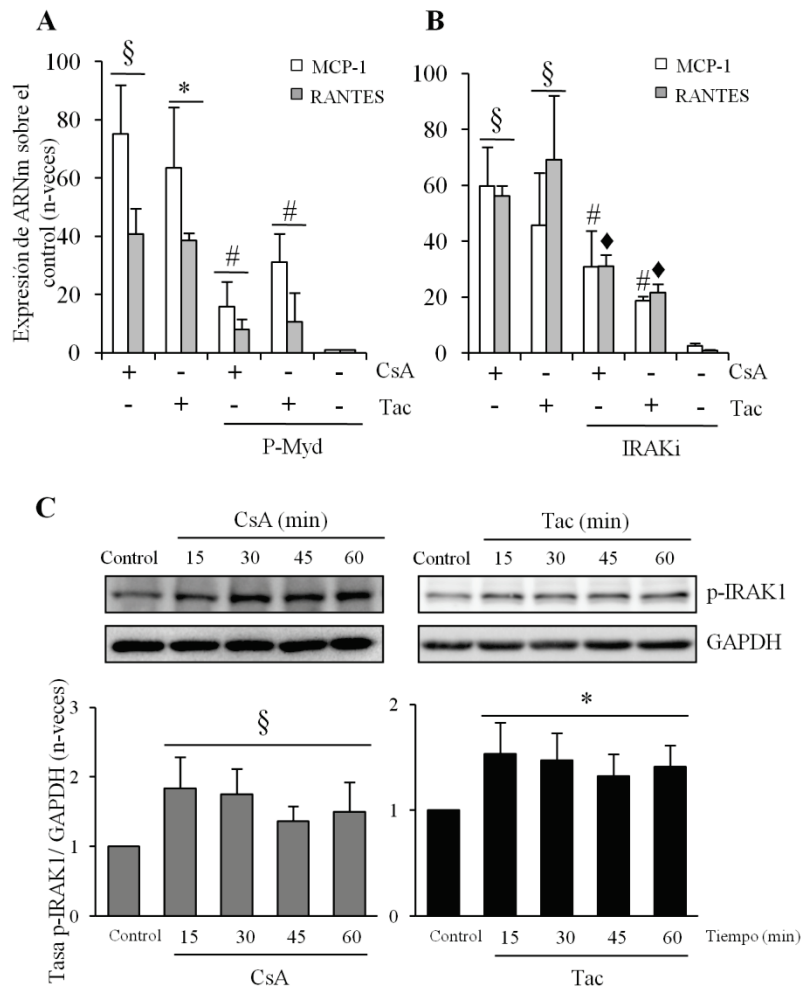
Los TLRs son sensores de la inmunidad innata con un papel clave en la iniciación de la inflamación. TAK-1, por su parte, tiene un papel esencial y no redundante en la activación de

las rutas NF- $\kappa$ B y MAPK mediante la transmisión de aquellas señales originadas en los TLRs<sup>235</sup>. Dado que TAK-1 media en la reacción inflamatoria originada por los CNIs en las células tubulares (**figs. 15A y B**), exploramos la posibilidad de que esta activación pudiera ser debida al involucramiento de receptores TLRs. Para ello, primeramente inhibimos la proteína adaptadora MyD88 con el péptido competidor Pepinh-Myd, que contiene una secuencia correspondiente al dominio TIR de homodimerización de MyD88. Este tratamiento atenuó sensiblemente los incrementos de MCP-1 y Rantes dependientes de CsA y Tac. De igual manera, la inhibición farmacológica de la quinasa asociada al receptor de interleuquina 1 (IRAK1), una diana proximal del complejo TLR4/MyD88 necesaria para la propagación de la señal, también redundó en la inhibición de la síntesis de ambas quimioquinas (**figs. 17A y B**). Consistentemente, también observamos que CsA y Tac son capaces de fosforilar rápidamente IRAK1 a partir de los 15 minutos (**fig. 17C**).

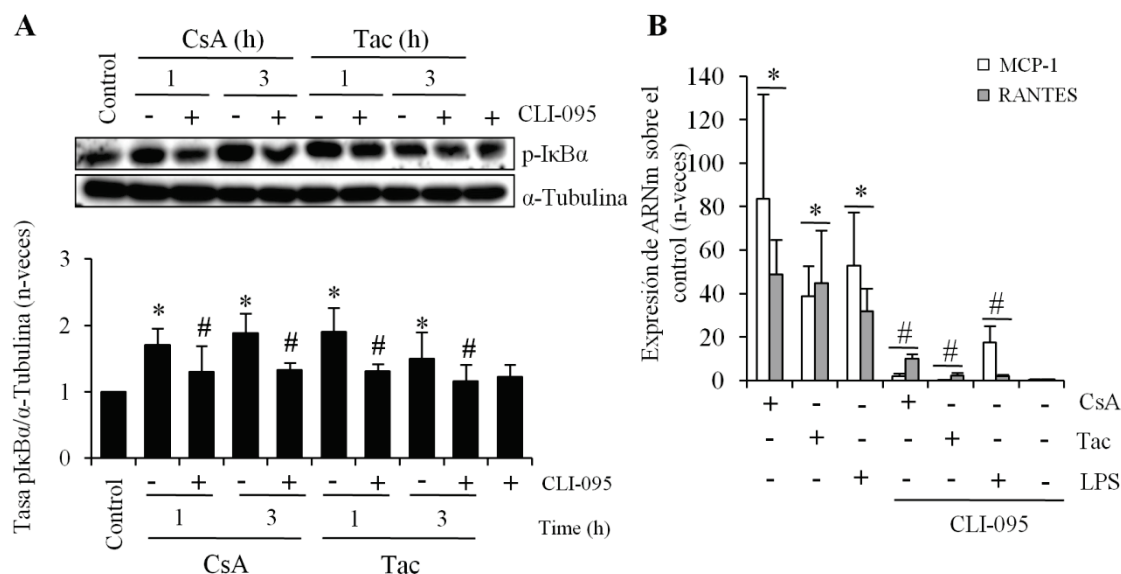
Como siguiente paso, quisimos saber si el receptor prototípico TLR4 participaba en la producción de eventos inflamatorios por los CNIs. La supresión específica de señalización del TLR4 se logró bloqueando su dominio intracelular con el inhibidor CLI-095/TAK-242. Como resultado, se suprimió la fosforilación/activación de I $\kappa$ B $\alpha$  a 1 y 3 horas (**fig. 18A**) y consecuentemente, la activación de NF- $\kappa$ B y la inducción dependiente de Rantes y MCP1 disparadas por los CNIs (**fig. 18B**).

Este resultado fue contrastado en células tubulares embrionarias HEK293 que no expresan TLR4. Como control de respuesta celular, se utilizó como estímulo TNF $\alpha$ . Esta citoquina, mediante unión a sus propios receptores, y de forma independiente a TLR4, inicia una ruta de señalización que resulta en la inducción de MCP-1. En nuestros ensayos, ni el tratamiento con CsA ni con LPS, utilizado como ligando específico de TLR4, resultó en aumentos transcripcionales de MCP1. Sin embargo, y de acuerdo a lo esperado, las células HEK293 tratadas con TNF $\alpha$  incrementaron la síntesis del ARNm del MCP-1 (aproximadamente entre 15 y 6 veces el valor del control después de 6 y 24 horas de tratamiento, respectivamente) (**fig. 19A**). Estos resultados sugieren que, en las células tubulares, el receptor TLR4 sería un elemento limitante para el inicio de la señalización por los CNIs, pues en su ausencia no se detectaron modificaciones en los niveles transcripcionales de MCP-1.

## 4. Resultados



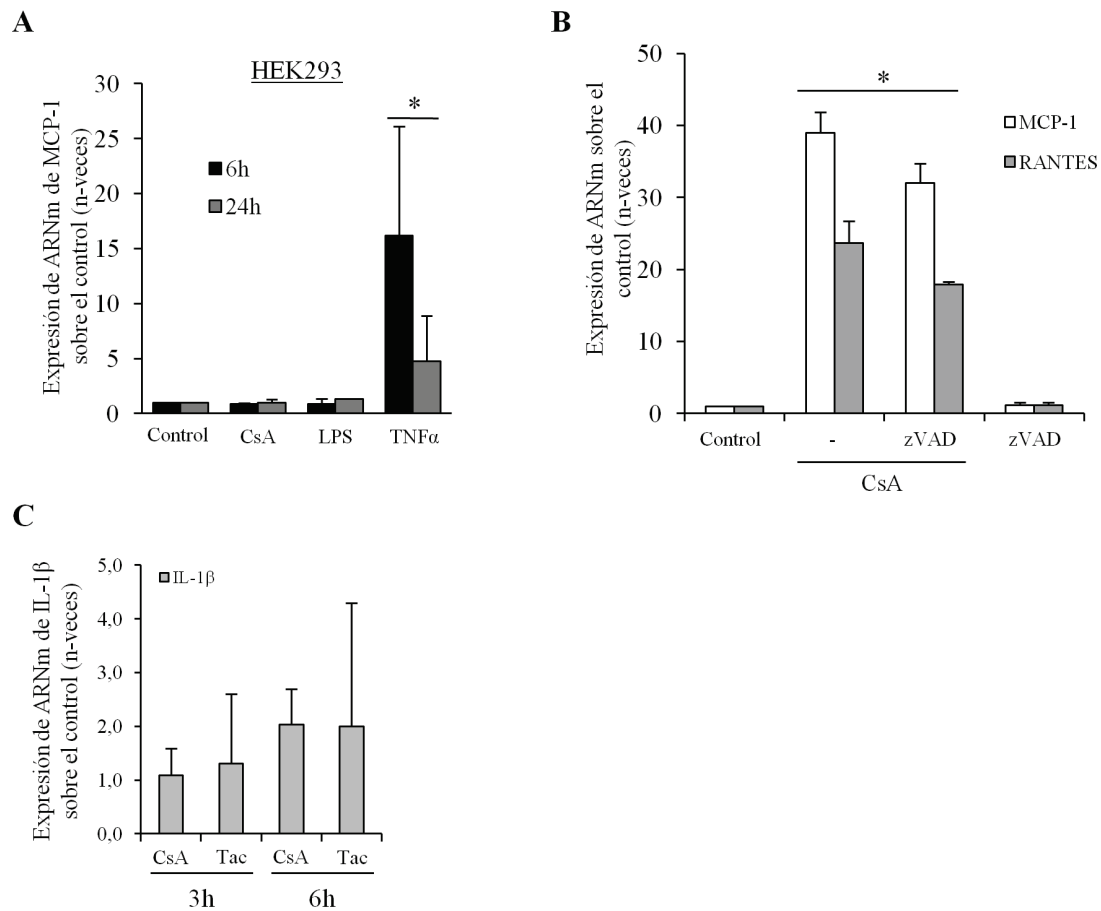
**Figura 17. A y B:** expresión de ARNm medida por RT-qPCR de MCP-1 y RANTES a 6 horas por CsA y Tac modificada por inhibidores de MyD88 y de IRAK (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p<0,05$  respecto al control; § indica  $p<0,02$  respecto al control; # indica  $p<0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p<0,02$  respecto al estímulo correspondiente). **C:** fosforilación de IRAK1 inducida por CsA y Tac a lo largo del tiempo, western blots representativos de la serie experimental e histogramas (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p<0,05$  respecto al control; § indica  $p<0,02$  respecto al control).



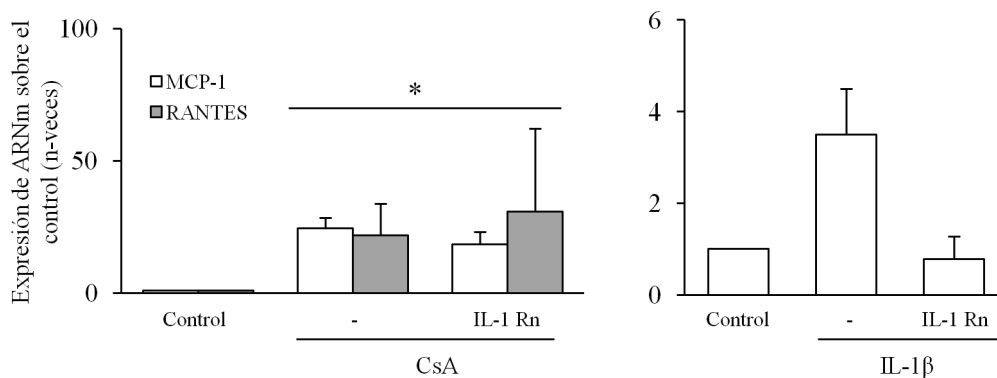
**Figura 18.** Panel A: western blot representativo de la serie experimental e histograma del efecto del inhibidor de TLR4 CLI-095 sobre la fosforilación de IκBα a 1 y 3 horas de estimulación con CsA y Tac (los datos corresponden a media ± desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control y # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente). Panel B: inhibición por CLI-095 de la expresión génica inducida a 3 horas de MCP-1 y RANTES por CsA, Tac y LPS (los datos corresponden a media ± desv. est. de tres experimentos independientes medidos por RT-qPCR. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control y # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente).

Nuestros resultados previos con el péptido inhibidor de MyD88 sugerían una implicación de receptores TLR en los efectos proinflamatorios de los CNIs, confirmado en los experimentos con el inhibidor CLI-095 y en células HEK293. Sin embargo, el receptor de IL-1 (IL-1R) y de otros miembros de la superfamilia TLR/IL-1R también exhiben un dominio citoplásmico TIR que sirve como zona de anclaje para la activación o el reclutamiento de MyD88 e IRAK1/4<sup>235</sup>. Dado que IL-1 β está relacionada con la inflamación renal como un factor crítico tras el procesado por la caspasa-1 pro-inflamatoria y que ésta puede ser activada por los CNIs<sup>236</sup>, estudiamos si estos podían inducir inflamación mediante la implicación de esta vía de señalización. No obstante, el pre-tratamiento con z-VAD-fmk, un inhibidor de caspasas de amplio espectro (que incluye la inhibición de caspasa-1), no previno la respuesta pro-inflamatoria inducida por 10 µg/ml de CsA o 20 µg/ml de Tac en células MCTs tratadas durante 6 horas (**fig. 19B**). Además, la transcripción del transcripto de IL-1 β resultó indetectable en células tratadas y sin tratar con CsA (**fig. 19C**). Por último, el bloqueo de la actividad del IL-1R con el antagonista IL-1Rn no modificó la respuesta inflamatoria inducida por CNIs en células tratadas en las mismas condiciones de tiempo y con los mismos estímulos (**fig 20**).

#### 4. Resultados



**Figura 19.** A: Expresión de ARNm de MCP-1 inducida por CsA, LPS y TNF $\alpha$  en células de línea renal embrionaria humana HEK293, que no expresa TLR4 (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes medidos por RT-qPCR. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control). B: el inhibidor de caspasas z-VAD-fmk no bloquea la expresión de citoquinas proinflamatorias por CsA (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes medidos por RT-qPCR. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control). C: CsA y Tac no inducen una expresión significativa ni consistente del ARNm de IL-1 $\beta$  (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes medidos por RT-qPCR. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control).

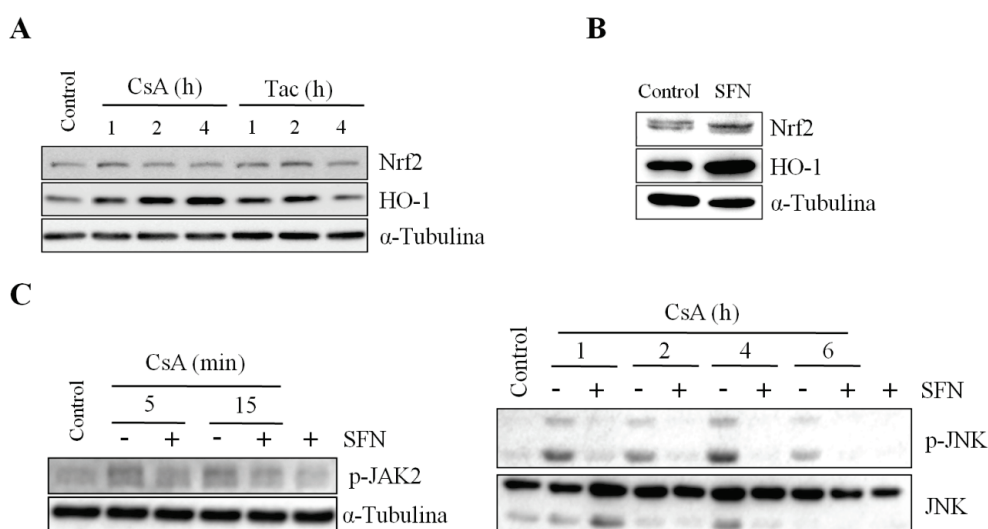


**Figura 20.** En la expresión génica de MCP-1 y RANTES inducida por CsA no media el receptor de IL-1  $\beta$  (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes medidos por RT-qPCR. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control).



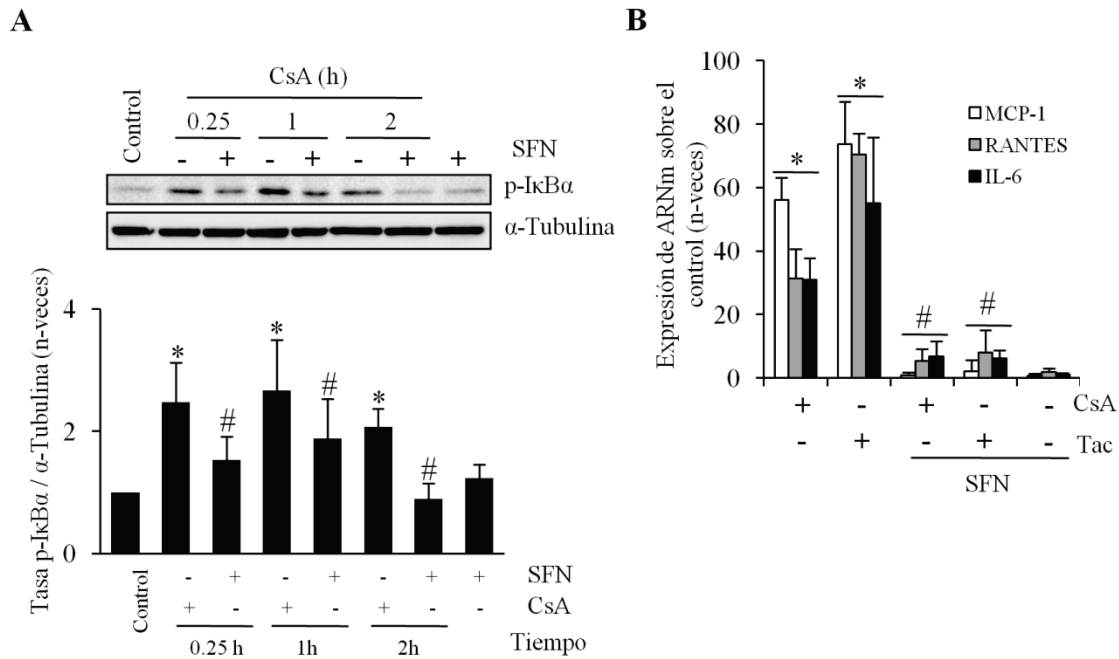
#### 4.6. Modulación por Nrf2 de la inflamación mediada por NF- $\kappa$ B en células tubulares renales murinas

La ruta de Nrf2 es activada en respuesta al estrés oxidativo y modula a la baja efectos proinflamatorios. El incremento en la expresión de hemoxygenasa 1 (Hmox1/HO-1), una diana de Nrf2, observado en el análisis transcriptómico sugería que los CNIs también podrían activar la ruta Nrf2 (**Tabla 2**). Como primera observación, los niveles de las proteínas Nrf2 y HO-1 se encontraron incrementados en las células MCT tratadas con ambos CNIs (**fig. 20A**). Para valorar el peso de la ruta Nrf2 en la protección frente a la inflamación inducida por los CNIs, tratamos células tubulares con el activador natural de Nrf2 Sulforaphane (SFN). Este compuesto incrementó los niveles de Nrf2 y HO-1 por sí solo en plazos de tiempo relevantes para el proceso inflamatorio (1-6 horas) (**fig. 20B**). Además, la activación de Nrf2, inhibió la fosforilación/activación de JAK2 y JNK (**fig. 20C**).



**Figura 20.** Panel **A**: incremento de proteína de Nrf2 y HO-1 inducido por estimulación con CsA y Tac. **B**: aumento de Nrf2 y HO-1 tras tratamiento con el activador Sulforaphane (SFN). **C**: efecto inhibitorio sobre fosforilación de JAK2 y JNK del SFN. Western blots representativos de experimentos independientes.

Por último, la fosforilación/activación de I $\kappa$ B $\alpha$ , así como la síntesis de mRNA de MCP-1, Rantes e IL-6, dependientes de NF- $\kappa$ B, también se vieron inhibidas por el SFN (figs. 8D y E). En conclusión, la activación del eje Nrf2/HO-1 puede limitar los eventos pro-inflamatorios mediados por CNIs a través de la interrupción de las rutas de señalización dependientes de quinasas o inhibiendo directamente la señales de activación curso arriba respecto a NF- $\kappa$ B. Activar Nrf2, por tanto, podría ser una opción terapéutica a explorar para limitar la inflamación inducida por CNIs.



**Figura 21.** Panel A: western blot representativo del efecto inhibitorio de SFN sobre la fosforilación de IkBα inducida por CsA. Panel B: inhibición por SFN de la expresión de ARNm a 6 horas de mediadores proinflamatorios inducida por CsA y Tac (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente).

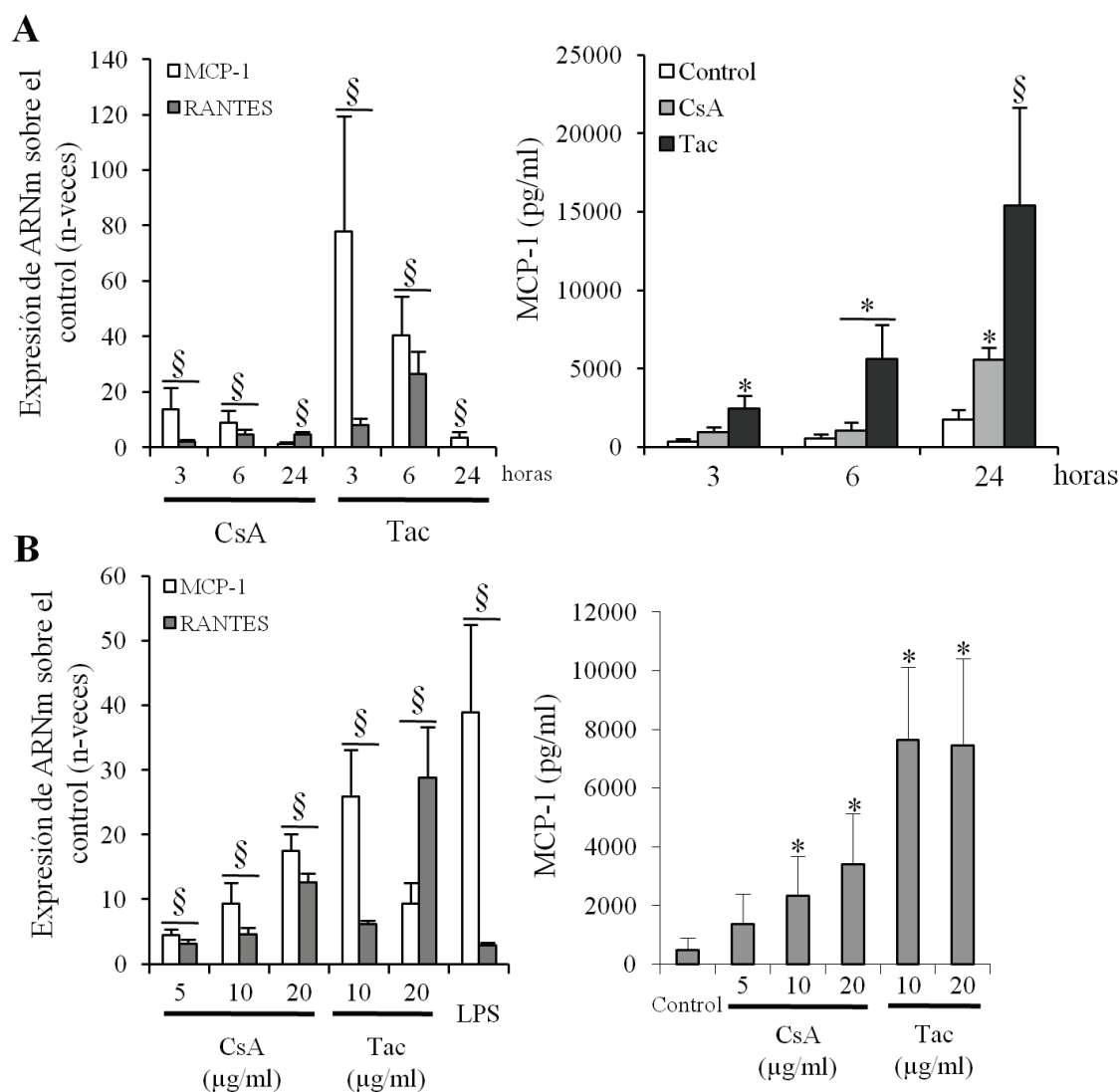
## II. ESTUDIOS DE MECANISMOS Y RUTAS DE SEÑALIZACIÓN PROINFLAMATORIAS INDUCIDAS POR LOS INHIBIDORES DE CALCINEURINA CICLOSPORINA A Y TACROLIMUS EN CÉLULAS ENDOTELIALES

### 4.7. Los CNIs inducen una respuesta inflamatoria rápida en células endoteliales microvasculares murinas en cultivo

A fin de comprobar la posible ocurrencia de inflamación como parte de los procesos tóxicos sobre la vasculatura descritos para los CNIs, realizamos estudios *in vitro* empleando cultivos celulares de la línea murina de endotelio de microvasculatura Mile-Sven 1 (MS1) tratadas con CsA y Tac.

Primeramente observamos que ambos CNIs causaron un incremento en la expresión del ARNm de MCP-1 y RANTES. La cinética temporal de expresión de estos genes seguía un patrón similar al descrito para las células tubulares renales MCT, con un máximo de expresión en torno a las 3 horas para MCP-1, y un retorno a valores aproximados a los basales sobre las 24 horas, mientras que en el caso de Rantes, su máximo llegaba sobre las 6 horas y mantenía una expresión significativamente alta aún a 24 horas (**fig. 22A, izquierda**). Este comportamiento celular se confirmó por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos, en los que se apreció diferencias en la secreción de MCP-1, que presentaba una respuesta rápida y

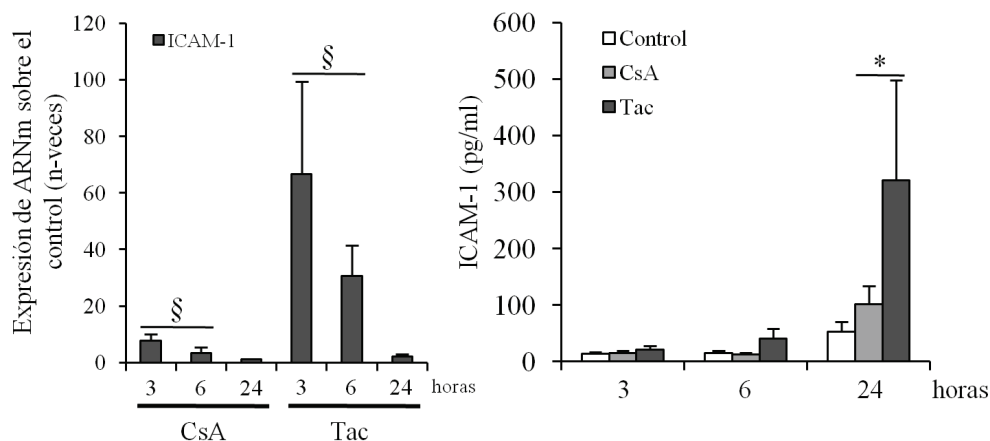
significativa sobre el control ya a seis horas tanto con CsA como con Tac (**fig. 22A, derecha**). La respuesta de las células endoteliales respecto a la dosis seguía un patrón similar al que mostramos previamente en las células tubulares MCT, con efectos más marcados para dosis de 20  $\mu\text{g/ml}$  que para las de 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$  (**fig. 22B, izquierda**). Además, la secreción de MCP-1 siguió este patrón de respuesta cuando se midieron sus niveles en los sobrenadantes por ELISA (**fig. 22B, derecha**).



**Figura 22.** A: a la izquierda, expresión de ARNm de las citoquinas MCP-1 y RANTES en función del tiempo de tratamiento (3, 6 o 24 horas) con CsA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) y Tac (20  $\mu\text{g/ml}$ ) medida por RT-qPCR; a la derecha, expresión directa de MCP-1 cuantificada por ELISA en las mismas condiciones (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica p < 0,05 respecto al control; § indica p < 0,02 respecto al control). B: a la izquierda, expresión de ARNm de las MCP-1 y RANTES en función de la dosis de CsA o Tac, con LPS como control positivo medida por RT-qPCR; a la derecha medida de MCP-1 por ELISA en las mismas condiciones (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica p < 0,05 respecto al control; § indica p < 0,02 respecto al control).

#### 4.8. Los inhibidores de calcineurina inducen activación endotelial en células MS1

En los endotelios, la expresión de moléculas de adhesión es un fenómeno proinflamatorio conocido como activación endotelial. ICAM-1 es un marcador prototípico de este proceso. Para conocer si este mecanismo era activado por los CNIs, se evaluó la síntesis génica y proteica de ICAM-1 en células MS1 tratadas con CsA y Tac. En estos tratamientos, el patrón temporal de expresión del ARNm de ICAM-1 en los tratamientos con ambos CNIs fue similar al observado al de MCP-1, con efectos más pronunciados para Tac, y con un máximo de expresión alrededor de las tres horas y progresiva reducción pero aún con aumentos significativos a seis horas. La expresión inducida de ICAM-1 fue corroborada mediante ELISA de los sobrenadantes de estas células, observándose que la secreción de la proteína alcanzaba valores significativos a las 24 horas y una mayor inducción con Tac, en forma coincidente con lo indicado por la cinética transcripcional (**fig. 23**).

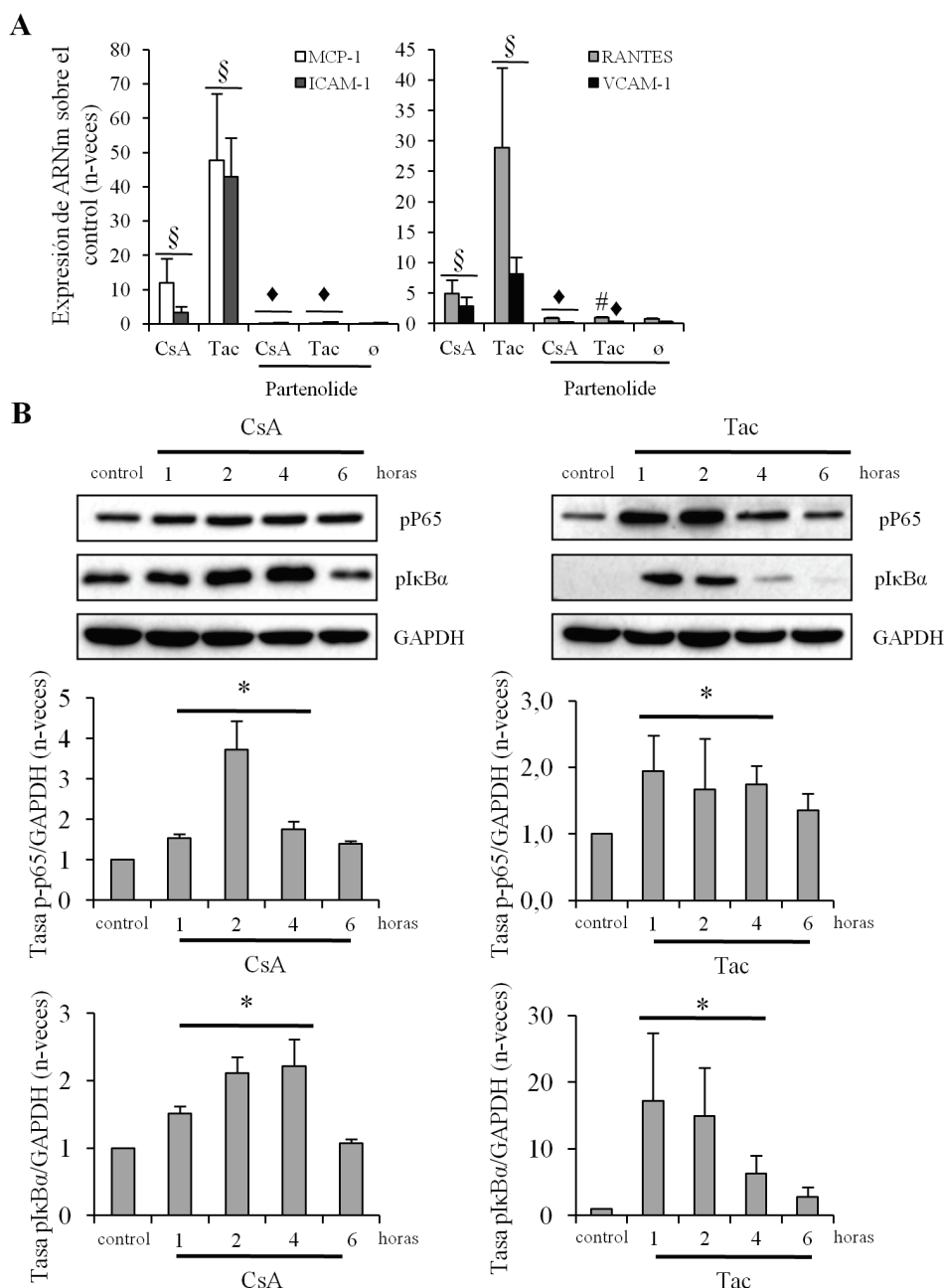


**Figura 23.** Expresión génica a lo largo del tiempo de la proteína de adhesión y marcador de activación endotelial ICAM-1 y correspondiente expresión temporal de la proteína cuantificada por ELISA (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control).

#### 4.9. NF- $\kappa$ B es un mediador de las respuestas proinflamatorias inducidas por los inhibidores de calcineurina en las células endoteliales

A continuación buscamos confirmar en células endoteliales la participación de NF- $\kappa$ B en la transcripción de citoquinas proinflamatorias y genes asociados a la activación del endotelio. Para ello comprobamos los niveles de expresión génica de las citoquinas MCP-1 y RANTES y de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 bajo estimulación con CNIs y co-tratamiento con el inhibidor farmacológico parthenolide (**fig. 24A**). En este caso, las células co-tratadas con el inhibidor y CsA o Tac presentaban una reducción drástica de la síntesis génica de MCP-1, RANTES, ICAM-1 y VCAM-1. Para confirmar la regulación de estas

respuestas por NF- $\kappa$ B, se estudiaron los niveles de fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y de p65 mediante western blot. Así, se observó que ambos CNIs inducían la fosforilación/activación de I $\kappa$ B $\alpha$  y de p65, aunque con cinéticas un tanto diferentes. En el caso de CsA, el pico de fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  se alcanzó a las 4 horas de tratamiento; mientras que para Tac este se alcanzó a la hora de tratamiento. Para el caso de p65, tanto con CsA como con Tac, se encontró una activación constante entre 1 y 4 horas de tratamiento (**fig. 24B**).

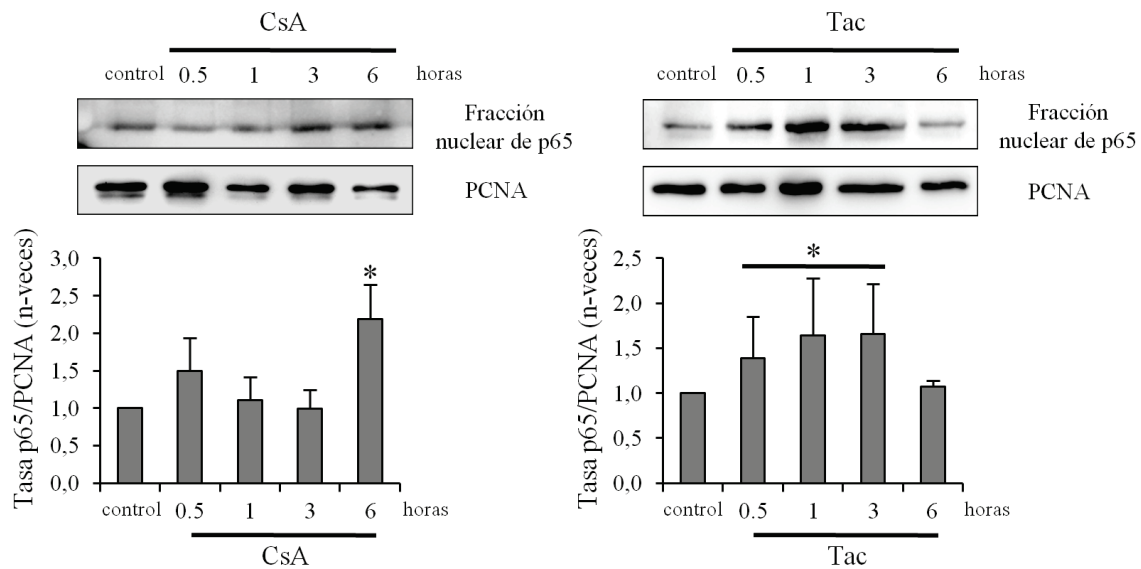


**Figura 24. A:** Expresión génica a 6 horas de las citoquinas MCP-1 y RANTES y las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 estimuladas con CsA y Tac y en co-tratamiento con parthenolide (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. medidas por RT-qPCR de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente). **B:** fosforilación de p65 e I $\kappa$ B $\alpha$  inducidas por CNIs; western blots representativos y sus histogramas

## 4. Resultados

de cuantificación. A la izquierda Tac y a la derecha CsA (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de cuatro experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control).

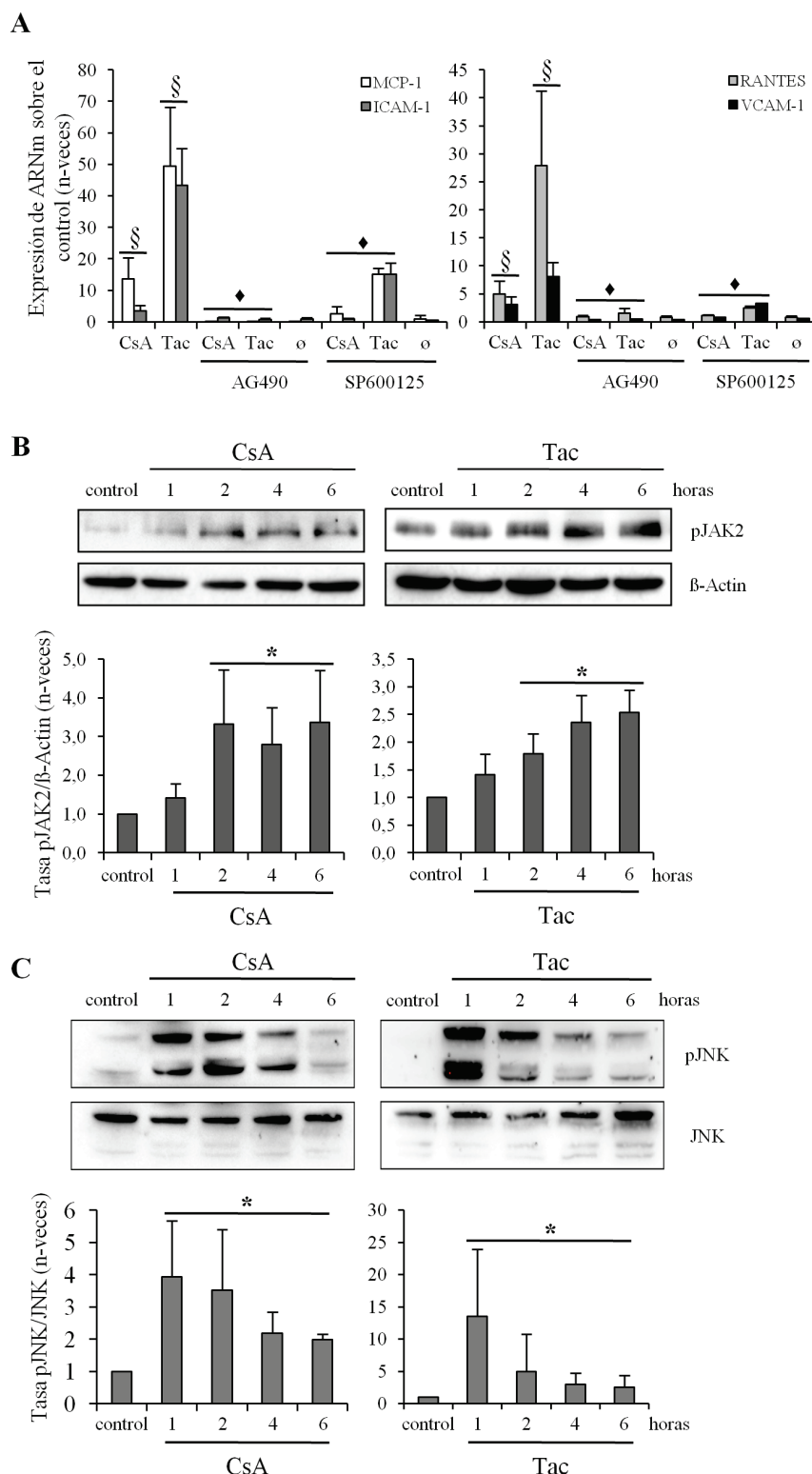
Finalmente, para confirmar la implicación de NF- $\kappa$ B, se evaluó el contenido de p65 en extractos nucleares mediante western blot, confirmándose que tanto CsA como Tac inducían su translocación (**fig. 25**).



**Figura 25.** Internalización nuclear de p65 medida por western blot en la fracción nuclear de extractos de proteínas de células MS1 tratadas con CsA y Tac a los tiempos indicados. (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de cuatro experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control)

### 4.10. Las proteínas quinasas JAK2 y JNK median la respuesta inflamatoria inducida por los CNIs en células endoteliales murinas

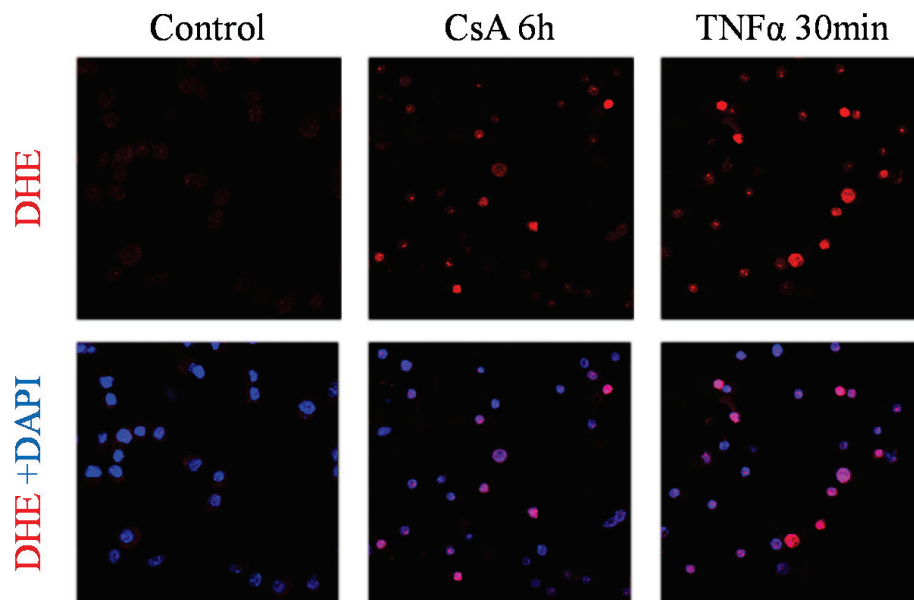
Resultados previos en nuestro laboratorio<sup>208</sup> demostraron que la inhibición de JAK2 protege células endoteliales y renales frente a la muerte celular causada por CsA. De acuerdo con estos antecedentes y con resultados de esta tesis sobre los efectos de la intervención de las rutas de JAK2 y JNK en las células tubulares, decidimos investigar si estas quinasas participaban también mediando los efectos proinflamatorios de CsA y Tac en las células endoteliales. En efecto, la intervención con AG490 prácticamente bloqueó la expresión génica de MCP-1, RANTES, ICAM-1 y VCAM-1, cuyos niveles permanecieron en torno a los de control en células tratadas con CsA y Tac; mientras que el uso de SP600125 redujo significativamente la inducción de los transcritos de estas proteínas (**fig. 26A**). Estos resultados sugerían la participación de JAK2 y JNK como mediadores ubicuos (independientes del tipo celular) de las acciones proinflamatorias de los CNIs. En efecto, mediante ensayos de western blot confirmamos que CsA y Tac fosforilaban ambas proteínas, dando cuenta de la activación de las mismas (**fig. 26B y C**).



**Figura 26. A:** expresión de ARNm de MCP-1, RANTES, ICAM-1 y VCAM-1 en MS-1 a 6 horas bajo estimulación con CsA y Tac y co-tratamiento con AG490 (inh. de JAK2) y SP600125 (inh. de JNK) (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p<0,05$  respecto al control; § indica  $p<0,02$  respecto al control; y ♦ indica  $p<0,02$  respecto al estímulo correspondiente). Western blots representativos de fosforilación de JAK2 (**B**) y JNK (**C**) por Tac (izquierda) y CsA (derecha) con histogramas de cuantificación. Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p<0,05$  respecto al control; § indica  $p<0,02$  respecto al control; y ♦ indica  $p<0,02$  respecto al estímulo correspondiente)

#### 4.11. Los inhibidores de calcineurina producen estrés oxidativo y la inhibición química de NADPH impide la síntesis de citoquinas proinflamatorias

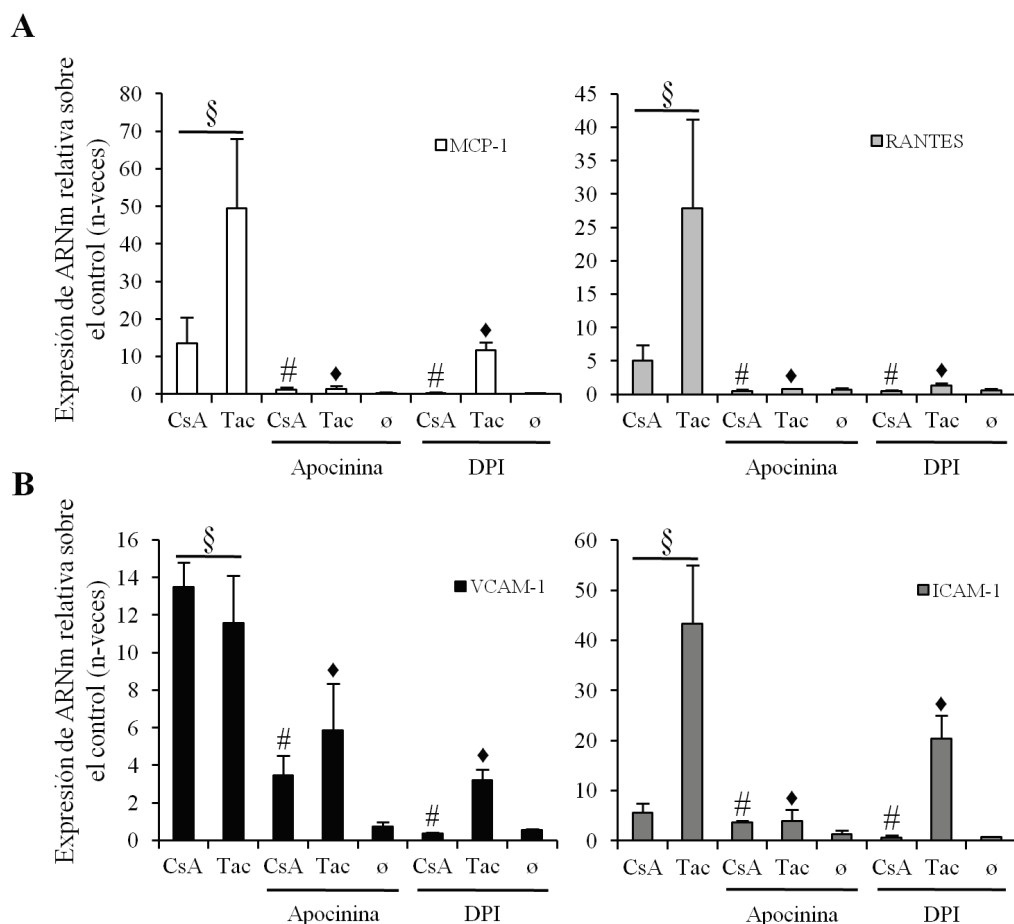
La producción de estrés oxidativo y la activación de NADPH están implicadas en la nefrotoxicidad crónica y la hipertensión por los CNIs, aunque su relación con los fenómenos inflamatorios se desconoce. Primeramente corroboramos que los CNIs inducen la activación de NADPH mediante la detección de la producción de anión superóxido por detección de fluorescencia con DHE (dihidroetidio) y microscopía confocal. Se pudo apreciar un aumento efectivo de la intensidad de la fluorescencia bajo estimulación con CsA a seis horas respecto al control. Como control positivo se utilizó TNF $\alpha$ .



**Figura 27.** Detección de estrés oxidativo por fluorescencia emitida por dihidroetidio (DHE). En la fila superior emisión de fluorescencia sólo por DHE (en rojo) y en la fila inferior emisión de DHE combinada con emisión de DAPI para contrastar núcleos (imágenes de microscopía confocal representativas de una serie de tres experimentos; magnificación original x400).

A continuación empleamos dos inhibidores de NADPH oxidasa, apocinina y difenilyodonio (DPI) para comprobar los efectos sobre la expresión inducida por los CNIs de los genes proinflamatorios y de moléculas de adhesión. Al pretratar las células con ambos compuestos y estimular con CsA o Tac se producía una reducción muy significativa de la expresión de los genes proinflamatorios (**fig. 28A**) y de moléculas de adhesión (**fig. 28B**), lo que indicaría que el estrés oxidativo y la actividad de NADPH son mediadores de los efectos proinflamatorios y de activación del endotelio por parte de los CNIs.





**Figura 28.** Reducción en la expresión génica medida por RT-qPCR de los genes proinflamatorios (A) y de moléculas de adhesión (B) inducidos por CsA y Tac (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. medidas por RT-qPCR de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente).

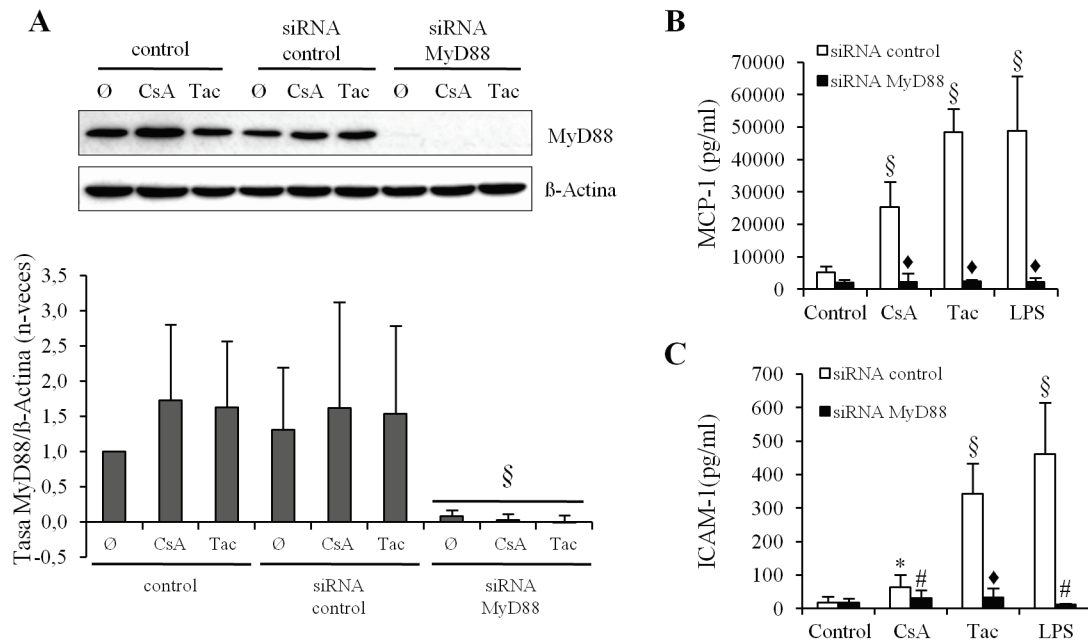
#### 4.12. Participación de receptores TLR en los eventos de señalización disparados por los CNIs en células endoteliales

En el capítulo 4.5. de esta tesis demostramos que en células tubulares los receptores TLR se activan por acción de los CNIs y que el inhibidor peptídico de MyD88 suprime la producción de quimioquinas proinflamatorias bajo el control transcripcional de NF- $\kappa$ B. Para investigar si los receptores TLR eran también importantes en los efectos inflamatorios directos de los CNIs sobre células endoteliales, y dada la facilidad de transfección de la línea MS1, se utilizó una aproximación molecular mediante supresión de MyD88 por silenciamiento génico.

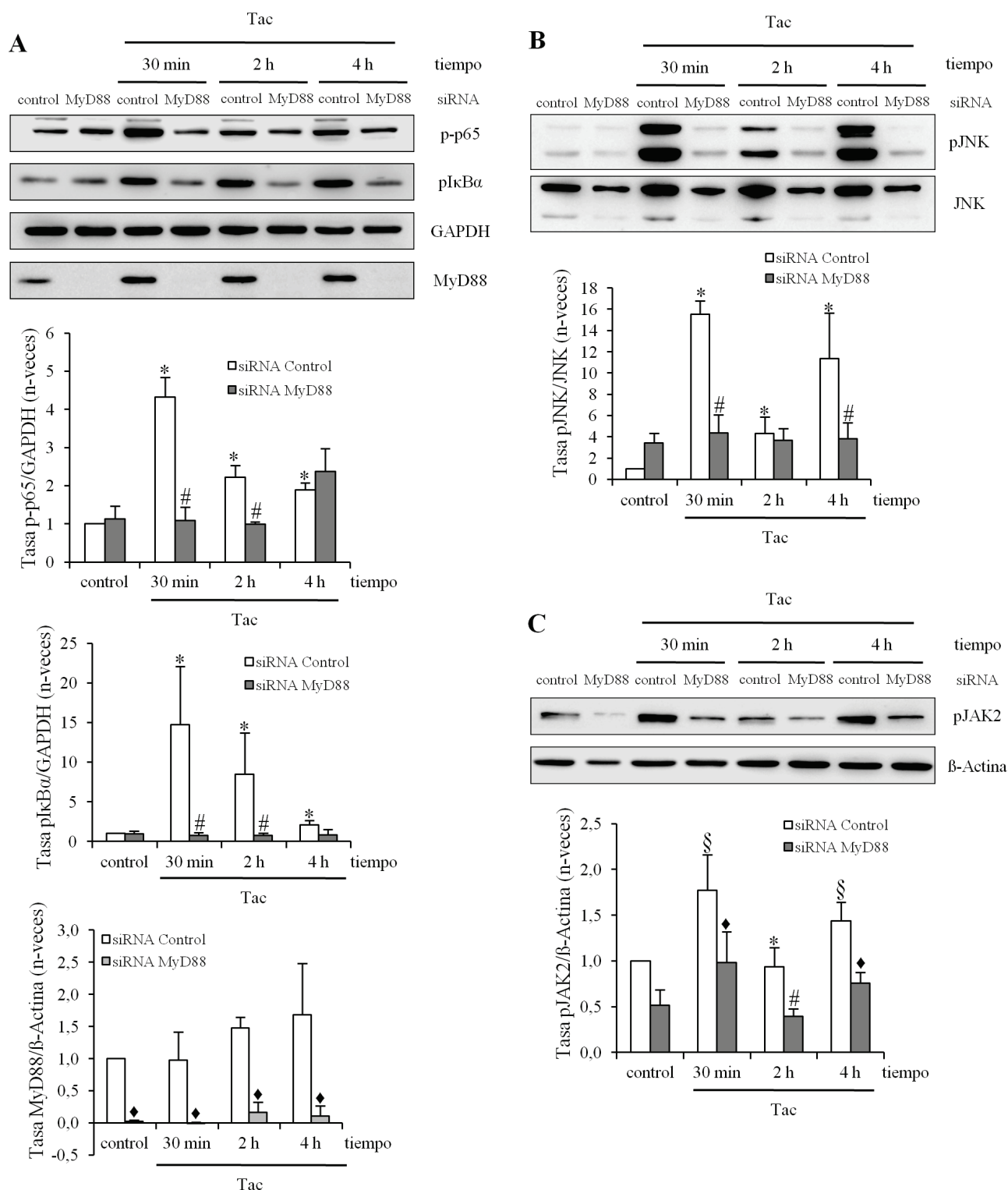
Inicialmente, comprobamos que la expresión de MyD88 no era afectada por el tratamiento con CsA o Tac y que el procedimiento de silenciamiento anulaba casi totalmente la expresión de MyD88 (**fig. 29A**). Por lo tanto, el siguiente paso fue estudiar en las células con MyD88 suprimido que ocurría con la síntesis de factores proinflamatorios inducidos en

#### 4. Resultados

respuesta a CsA y Tac. En relación a esto, se observó que el silenciamiento génico de MyD88 inhibía completamente la síntesis génica de MCP1 y de ICAM1 propiciada por CsA y Tac, como así también por LPS, utilizado como control positivo de activación de señales por la ruta de TLR (**figs.29B y 29C**).



**Figura 29. A:** silenciamiento de la expresión génica de MyD88 mediante siRNA con estimulación por CsA, Tac. Western blots representativos de la serie completa de experimentos e histogramas de cuantificación mostrando una supresión efectiva de ambas proteínas. Se incluyen carriles sin siRNA (marcados como control) para evidenciar que no hay efectos intrínsecos del método de silenciamiento (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de seis experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control). Medida de expresión de MCP-1 (**B**) y de ICAM-1 (**C**) por ELISA en sobrenadantes de células silenciadas con siRNA control y contra MyD88 estimuladas 24 horas con CsA, Tac y LPS (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de seis experimentos independientes).

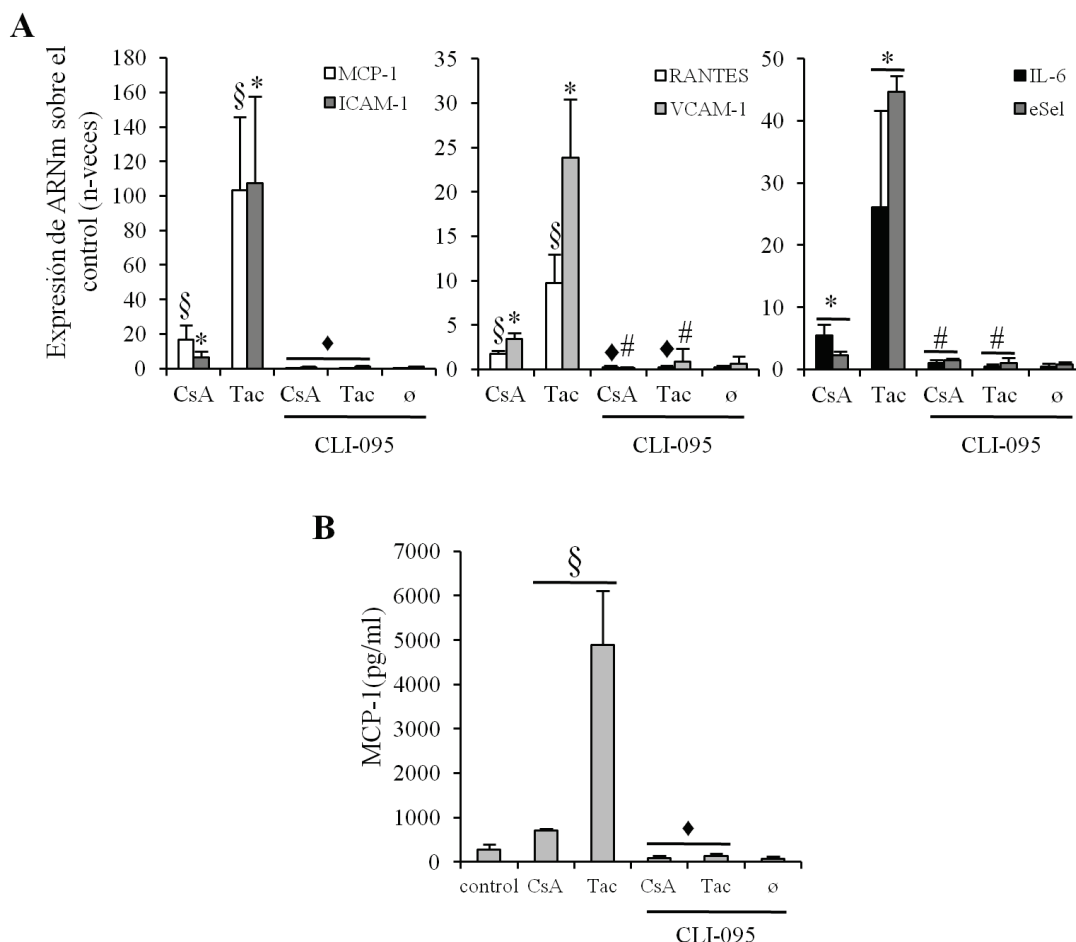


**Figura 30. A:** dinámica de fosforilación de p65 y de I $\kappa$ B $\alpha$  inducidas por estimulación con Tac en células endoteliales MS-1 sometidas a silenciamiento con siRNA contra MyD88. **B:** efectos sobre fosforilación de JNK del silenciamiento de MyD88. **C** exhibe la fosforilación de JAK2 bajo silenciamiento de MyD88. En la parte superior de cada panel se ofrecen Western blots representativos de los experimentos de silenciamiento y debajo los histogramas de cuantificación correspondientes a la serie de experimentos. (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de cuatro experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al mismo tiempo con Tac; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al mismo punto temporal con Tac).

Por otra parte, en las células MS-1 con silenciamiento de MyD88 se investigó si las rutas de quinasas activadas por los CNIs eran dependientes de la actividad de receptores TLR. Para esta serie de experimentos se utilizó el Tac como CNI representativo. Así, en las células transfectadas con un ARN de interferencia control, y de acuerdo a los resultados previos, el Tac activaba la ruta de NF- $\kappa$ B evaluada por incrementos en la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y p65 (**fig. 30A**), como así también las quinasas JAK2 y JNK que resultaron fosforiladas por el tratamiento (**fig. 30B y C**). Sin embargo, en las células con expresión de MyD88 suprimida, la fosforilación de todas las proteínas permanecía en niveles cercanos a los basales a todos los tiempos estudiados (**fig. 30**). Estos experimentos evidenciaron de forma clara que la activación de rutas de quinasas que intervienen como mediadores de los efectos inflamatorios de los CNIs se sitúan corriente abajo de la activación de receptores TLR.

### **4.13. El receptor TLR4 media la respuesta inflamatoria y la activación endotelial inducida por los inhibidores de calcineurina en células endoteliales murinas**

Las evidencias experimentales sobre la participación de TLR4 obtenidas con las células tubulares y los resultados de los experimentos de silenciamiento de MyD88, motivaron nuestro estudio de la posible participación del TLR4 como intermediario de los efectos de los CNIs en el endotelio. El cotratamiento de las células MS-1 con los CNIs y con el inhibidor del TLR4 CLI-095/TAK-242 evidenció que la respuesta génica de los mediadores inflamatorios MCP-1, RANTES e IL-6; y de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y e-Selectina quedaba totalmente suprimida, señalando la participación de TLR4 en los procesos de inflamación y activación endotelial estimulados por los CNIs (**fig. 31A**). Además, la medida directa de MCP-1 en sobrenadantes mediante ELISA arrojó un resultado consistente con el de los ensayos de RT-qPCR, ya que las muestras tratadas con CLI-095 presentaban niveles similares a los del control (**fig. 31B**).



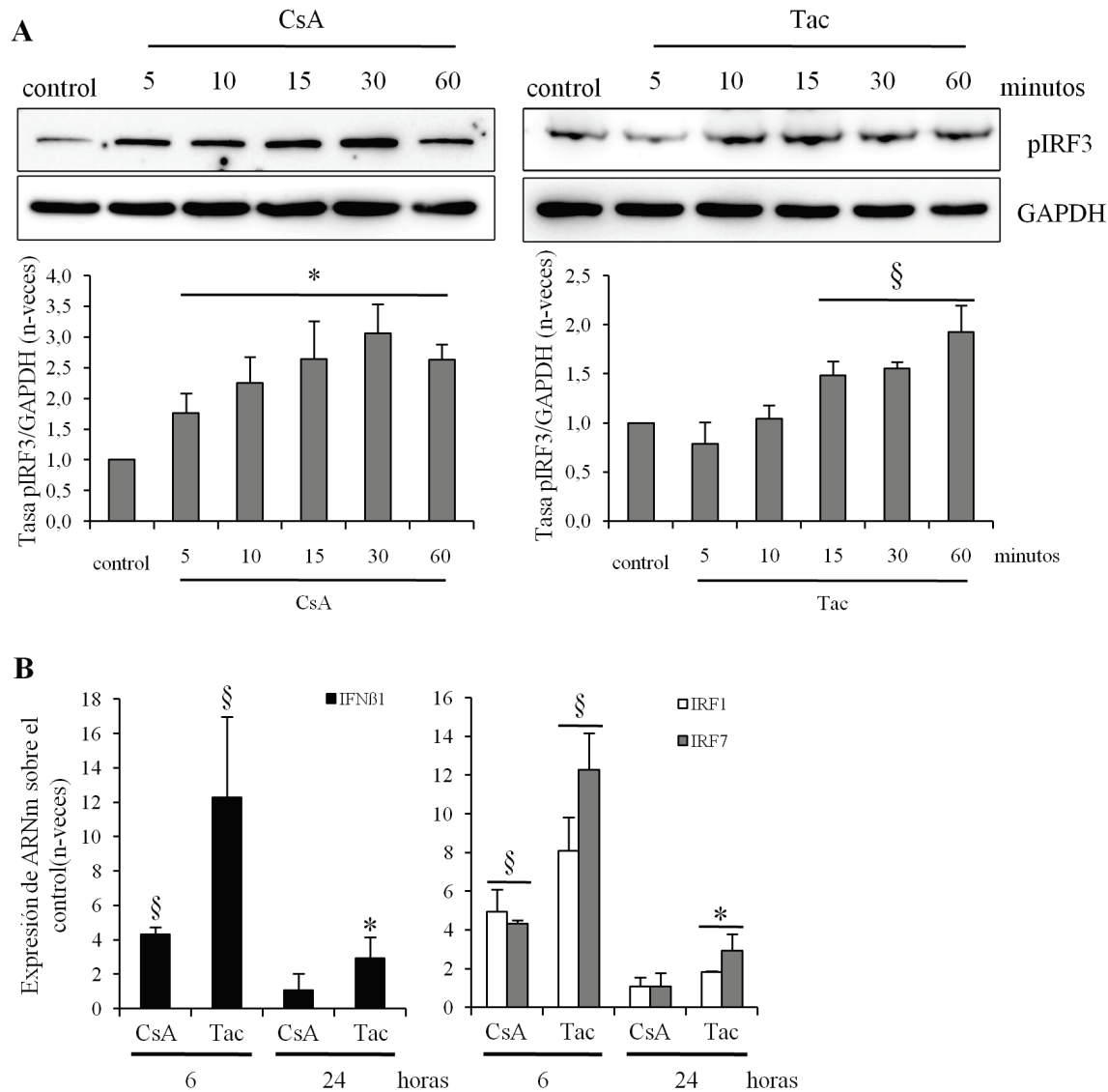
**Figura 31. A:** expresión génica en MS-1 a 3 horas inducida por CNIs y bajo pre-tratamiento con CLI-095. **B:** medida directa por ELISA de MCP-1 en sobrenadantes de MS-1 en las mismas condiciones que en **A** (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente.)

#### 4.14. Papel del adaptador TRIF en la señalización por TLR4 inducida por ciclosporina y tacrolimus

La formación de complejos de señalización del TLR4 mediante adaptación por la proteína TRIF también contribuye a la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Para conocer si los CNIs eran capaces de activar la ruta de señalización TLR4/TRIF, se analizaron los niveles de fosforilación del factor de transcripción IRF3, utilizado como reportero del ensamblaje del complejo proximal TLR4/TRIF/TBK1, cuya formación es un paso limitante para la señalización por la vía TRIF. Los ensayos de western blot demostraron que tanto CsA como Tac inducen fosforilación de IRF3, que en el caso de CsA, ocurría de forma más rápida y pronunciada que con Tac (**fig. 32A**). Otra consecuencia de la implicación de la ruta TLR4/TRIF/IRF3 es la síntesis de interferones tipo 1, como el  $\text{INF}\beta$ , previamente involucrado como mediador del daño renal. Efectivamente, las células endoteliales tratadas con CsA y Tac mostraron incrementos

#### 4. Resultados

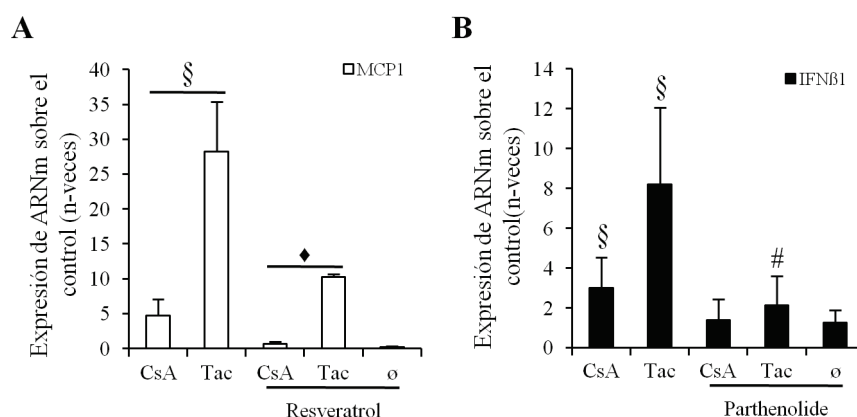
rápidos (6 hs) de la síntesis génica de  $\text{INF}\beta$ , que se mantuvo después de 24 hs, aunque en niveles menores. Esta respuesta, junto con otros IRFs, como IRF1 e IRF7 que se inducen por señalización por TRIF y MyD88 y que también se encontraron inducidos por CsA y Tac (**fig. 32B**), conforma un set de genes probablemente involucrados en la respuesta inflamatoria por los CNIs.



**Figura 32. A:** fosforilación de IRF3 en células MS-1 a tiempos cortos con Tac (izquierda) y CsA (derecha) (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control). **B:** Expresión de genes dependientes de TRIF (IRF1, IRF7 e  $\text{INF-}\beta 1$ ) inducida por CsA y Tac en células MS-1 a 6 y 24 horas medida por RT-qPCR (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; y # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente).

Para confirmar la funcionalidad de la activación de IRF3 sobre la respuesta inflamatoria de los CNIs, se inhibió esta activación mediante el pretratamiento de las células con resveratrol<sup>237</sup>, seguido de su incubación con CsA o Tac (**fig. 33A**). Efectivamente, este tratamiento produjo la inhibición de la síntesis génica de MCP-1 inducida por CsA y Tac (**fig.**

**33A).** También se comprobó que esta respuesta actúa en tándem con NF- $\kappa$ B, ya que el uso de partenolide también inhibió la síntesis de INF $\beta$ 1 (**fig. 33B**).

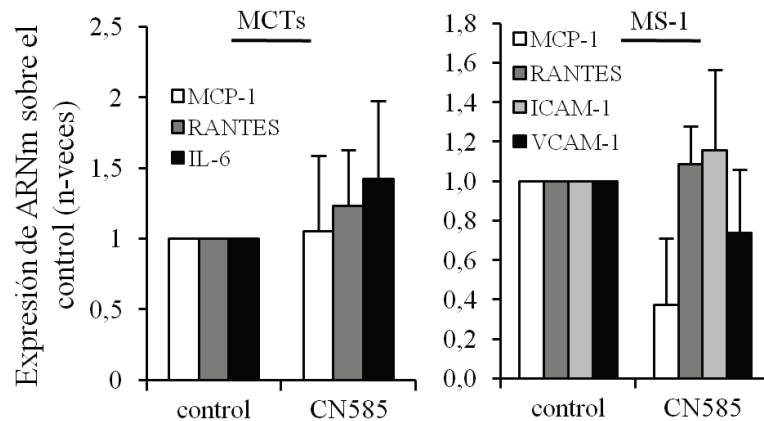


**Figura 33. A:** expresión génica de MCP-1 en células MS1 estimuladas con CsA y Tac y en las mismas condiciones pero pre-incubadas con resveratrol (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control; ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente). **B:** síntesis de ARNm de IFN  $\beta$ 1 inducida por CsA y Tac en células MS1 con o sin pre-tratamiento con el inhibidor partenolide (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control y # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente).

#### 4.15. Rol de calcineurina en la regulación de la respuesta inflamatoria inducida por los inhibidores de calcineurina en células endoteliales

La participación de CaN como regulador de los efectos proinflamatorios renales de los CNIs es desconocida. Los estudios precedentes permitieron comprobar mecanismos conservados que median los efectos inflamatorios de los CNIs tanto en células tubulares como en endoteliales. Para estudiar si CaN tiene un papel en la modulación de los mecanismos inflamatorios inducidos por los CNIs, primeramente se investigó si la interacción de los inhibidores con la enzima bastaba por sí solo para inducir la síntesis de genes inflamatorios y de activación endotelial. Mediante el uso del inhibidor farmacológico de CaN denominado CN585<sup>238</sup>, que interacciona con el centro activo de CaN de manera similar a CsA y Tac, se estudiaron los efectos sobre la respuesta génica de mediadores inflamatorios y moléculas de adhesión en células MS-1. Se observó que este tratamiento no producía un incremento significativo en la expresión génica de ninguna de las moléculas estudiadas. Además, este resultado se confirmó en células tubulares, donde tampoco se observaron efectos significativos por el tratamiento (**fig. 34**).

#### 4. Resultados



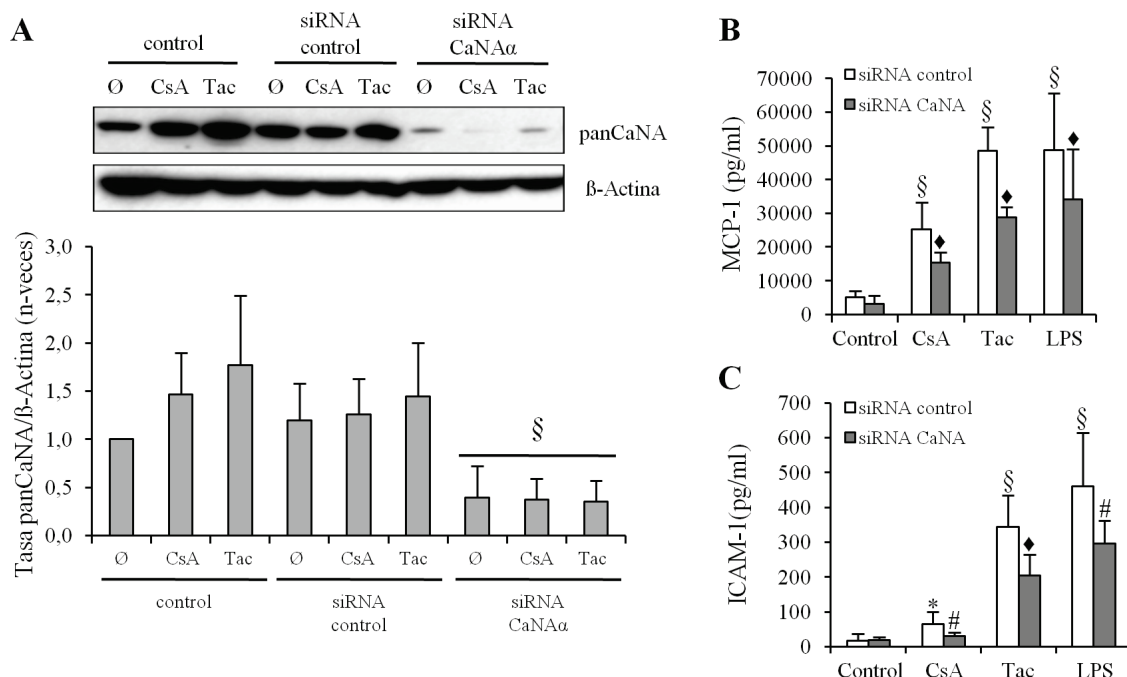
**Figura 34.** Expresión de ARNm en células epiteliales tubulares renales MCT (izquierda) y en células endoteliales microvasculares MS-1 (derecha) de quimioquinas inflamatorias y moléculas de adhesión. Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes.

Los resultados con el inhibidor CN585 sugerían que la supresión de la actividad basal de CaN no era un estímulo para la regulación de la respuesta transcripcional de genes proinflamatorios. Para investigar si los efectos de los CNIs eran dependientes de su interacción con CaN, se utilizó una segunda aproximación experimental mediante la delección de la expresión de la subunidad catalítica de la CaN (CaNA $\alpha$ ) mediante RNA interferente. Primero corroboramos que las células MS-1 transfectadas con un RNAi específico para CaNA $\alpha$  exhibían una supresión casi total de la expresión de la fosfatasa (**fig. 35A**). Seguidamente, se trataron estas células con CsA y Tac como estímulos de interés específico y con LPS como estímulo control de activación de TLR4, observándose que el silenciamiento de CaNA $\alpha$  solo inhibía la secreción de MCP-1 e ICAM-1 en un porcentaje aproximado al 40 % en todos los tratamientos (**figs. 35B y 35C**). Este resultado indicaría que la interacción de CsA con la CaN no es crítica para la inducción de la respuesta proinflamatoria de los CNIs, sugiriendo que esta puede deberse principalmente a efectos “off target”.

Para conocer si las vías de señalización que son activadas y median las respuestas inflamatorias de los CNIs son reguladas en forma diferente en ausencia de CaN, primeramente se evaluó la actividad de vías activadas por TLR4/MyD88 en las células con CaNA $\alpha$  silenciada. El análisis de la ruta de NF- $\kappa$ B y de JNK demostró que, en las células con silenciamiento de CaNA $\alpha$  y tratadas con Tac, no se producían diferencias en el estado de fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y p65 (**fig. 36A**) y tampoco en el de JNK (**fig. 36B**) con respecto a las células transfectadas con el RNAi control, permaneciendo por lo tanto todas estas proteínas activadas. Sin embargo, el silenciamiento de CaNA $\alpha$  producía una reducción significativa de la fosforilación de JAK2 inducida por Tac, comparado con los niveles incrementados observados en las células con RNAi control. Por otra parte, en las células con CaNA $\alpha$  silenciada también se



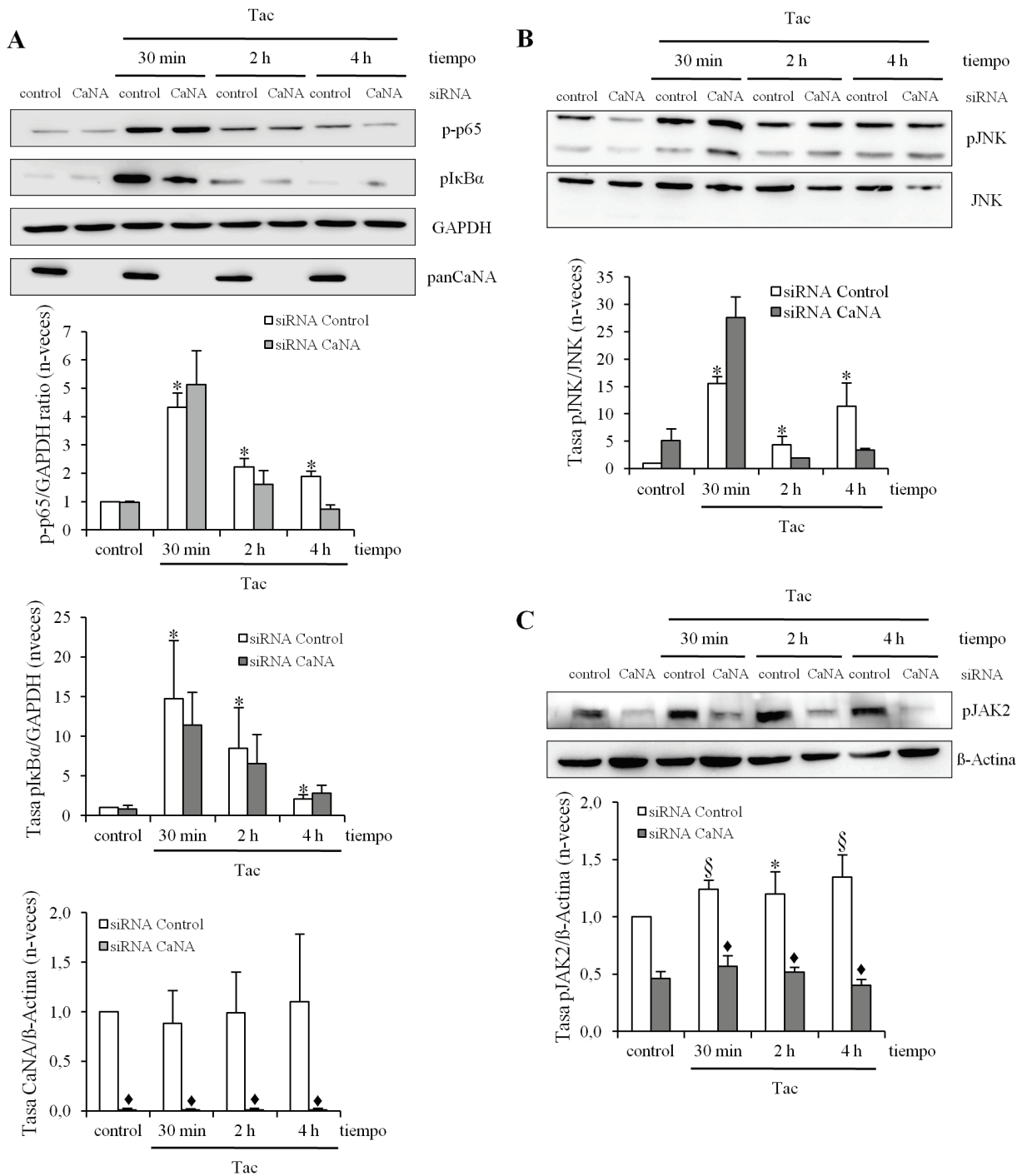
evaluó el comportamiento de la vía TRIF, evidenciándose una inhibición total de la fosforilación de IRF3 (**fig.37**).



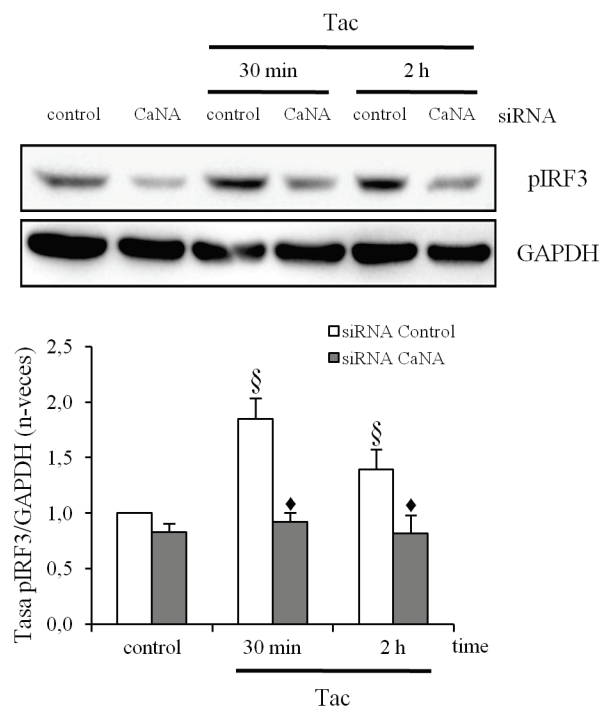
**Figura 35.** A: silenciamiento de la expresión génica CaNAα mediante siRNA con estimulación por CsA, Tac. Western blots representativos de la serie completa de experimentos e histogramas de cuantificación mostrando una supresión efectiva de ambas proteínas. Se incluyen carriles sin siRNA (marcados como control) para evidenciar que no hay efectos intrínsecos del método de silenciamiento (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de seis experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control). Medida de expresión de MCP-1 (**B**) y de ICAM-1 (**C**) por ELISA en sobrenadantes de células silenciadas con siRNA control y contra MyD88 y CaNAα y estimuladas 24 horas con CsA, Tac y LPS (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de seis experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al estímulo correspondiente; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente).

Por otra parte, ya que MyD88 media en la ruta de activación de casi todos los TLRs y existían evidencias previas de la implicación del TLR2 en fenómenos de daño renal, recurrimos al ácido lipoteicoico (LTA), un activador del TLR2, para excluir posibles efectos de este receptor sobre la síntesis de MCP-1 e ICAM-1. Comprobamos por medida directa de MCP-1 e ICAM-1 en sobrenadantes de las células silenciadas y estimuladas con LTA, que efectivamente éste no iniciaba por sí solo una respuesta que implicase un incremento ni de MCP-1 ni de ICAM-1 (**fig. 38**) y que, por lo tanto, la acción de CsA y de Tac en las células endoteliales MS-1 resulta enteramente dependiente de TLR4 y de MyD88 pero no de TLR2.

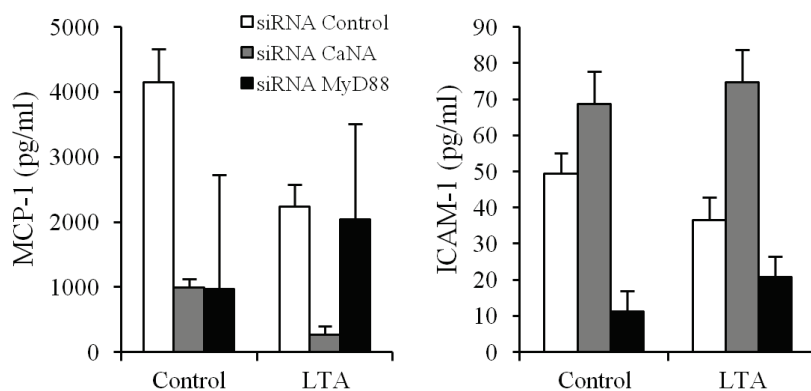
## 4. Resultados



**Figura 36. A:** dinámica de fosforilación de p65 y de IκBα inducidas por estimulación con Tac en células endoteliales MS-1 sometidas a silenciamiento con siRNA contra CaNAα. **B:** efectos sobre fosforilación de JNK del silenciamiento de CaNAα. **C** exhibe la fosforilación de JAK2 bajo silenciamiento de CaNAα. En la parte superior de cada panel se ofrecen Western blots representativos de los experimentos de silenciamiento y debajo los histogramas de cuantificación correspondientes a la serie de experimentos. (Los datos corresponden a media ± desv. est. de cuatro experimentos independientes. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control; § indica  $p < 0,02$  respecto al control; # indica  $p < 0,05$  respecto al mismo tiempo con Tac; y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al mismo punto temporal con Tac).



**Figura 37.** Fosforilación de IRF3 en células silenciadas con con siRNA contra CaNAα. En la parte superior se muestran Western blots representativos y en la inferior los histogramas de cuantificación de la serie experimental completa. (Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de cuatro experimentos independientes. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente).



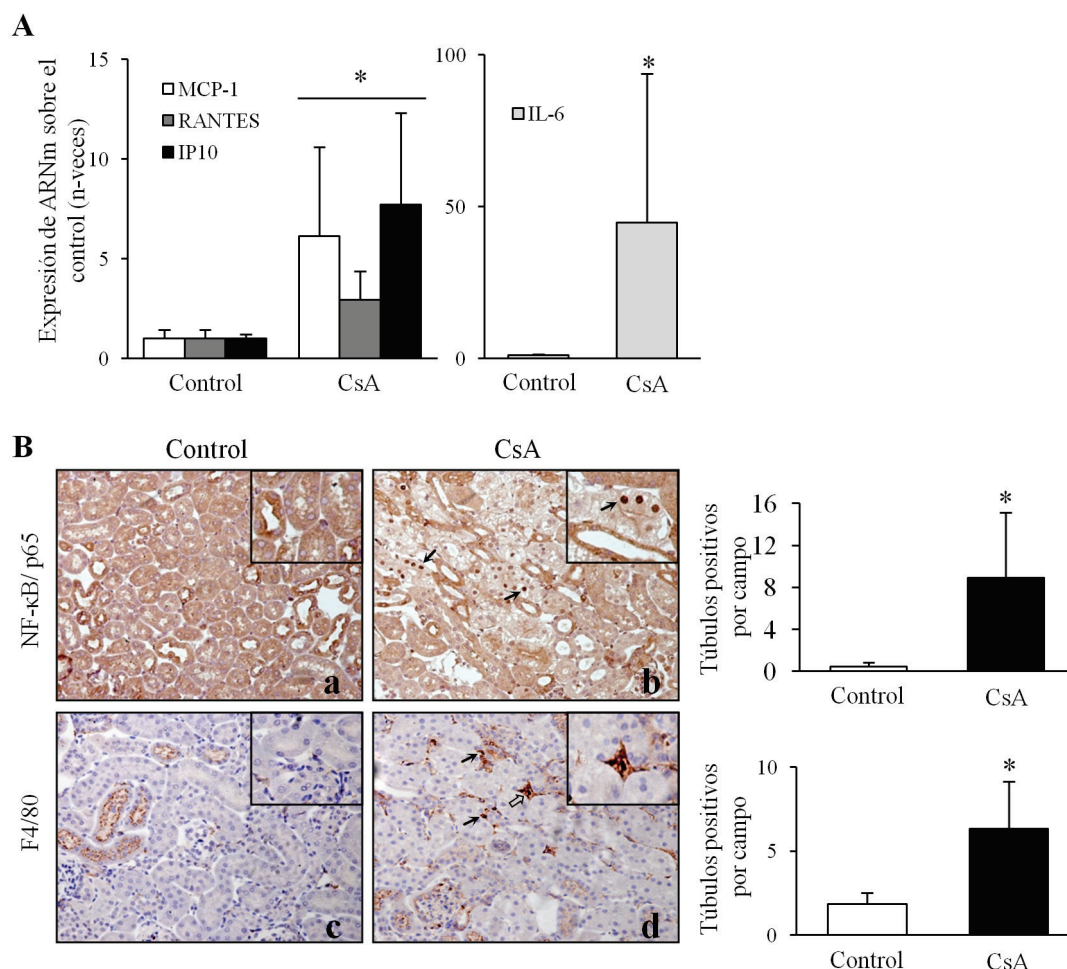
**Figura 38.** Medida de expresión de MCP-1 (izquierda) y de ICAM-1 (derecha) a en sobrenadantes de células MS-1 silenciadas con siRNA control y contra MyD88 y CaNAα y estimuladas 24 horas con LTA. Los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. de tres experimentos independientes.

### III. ESTUDIOS IN VIVO. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL INDUCIDA POR CICLOSPORINA Y PAPEL DE TLR4 EN ESTA RESPUESTA.

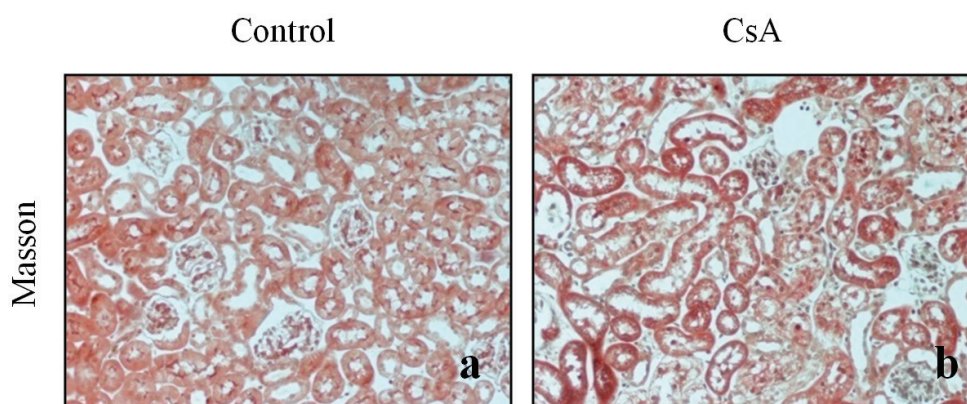
#### 4.16. La ciclosporina induce inflamación renal *in vivo*

Los efectos de los CNIs relacionados con la inflamación renal se evaluaron *in vivo* en un modelo murino de nefrotoxicidad acelerada por CsA descrito previamente<sup>208</sup>. En este modelo se había estudiado el rol de la señalización por la ruta JAK2/STAT3 en el daño tubular provocado por CsA. Dado que en los experimentos en células tubulares y endoteliales demostramos efectos proinflamatorios de esta vía se consideró este modelo como válido para estudiar la ocurrencia de inflamación y el comportamiento de la ruta JAK/STAT y de otros mediadores inflamatorios previamente identificados en los modelos celulares.

En los riñones de los animales tratados con CsA durante 5 días, en primer lugar se midieron los niveles transcripcionales de citoquinas inflamatorias, observándose aumentos significativos de MCP-1, Rantes e IP10 y también de IL-6, con respecto a su expresión basal en los animales del grupo control (**fig. 39A**). En forma correlativa a esta mayor expresión de citoquinas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B, en el grupo de ratones tratados con CsA, se detectó un claro incremento del número de túbulos cuyas células presentaban translocación nuclear de NF- $\kappa$ B/p65, en contraposición a los animales del grupo control, donde se observó una expresión basal del factor de transcripción mayoritariamente en el citoplasma de las células tubulares (**fig. 39B**). Además, se observó también un aumento efectivo del tránsito de células inflamatorias que se tradujo en un claro aumento del infiltrado de macrófagos detectados por una mayor expresión del marcador F4/80 (**fig. 39B**). Un hecho remarcable fue que las manifestaciones de inflamación no se acompañaban de la síntesis de MEC evaluada por tinción de Masson, señalando que la inflamación precedía a la fibrosis (**fig. 40**).



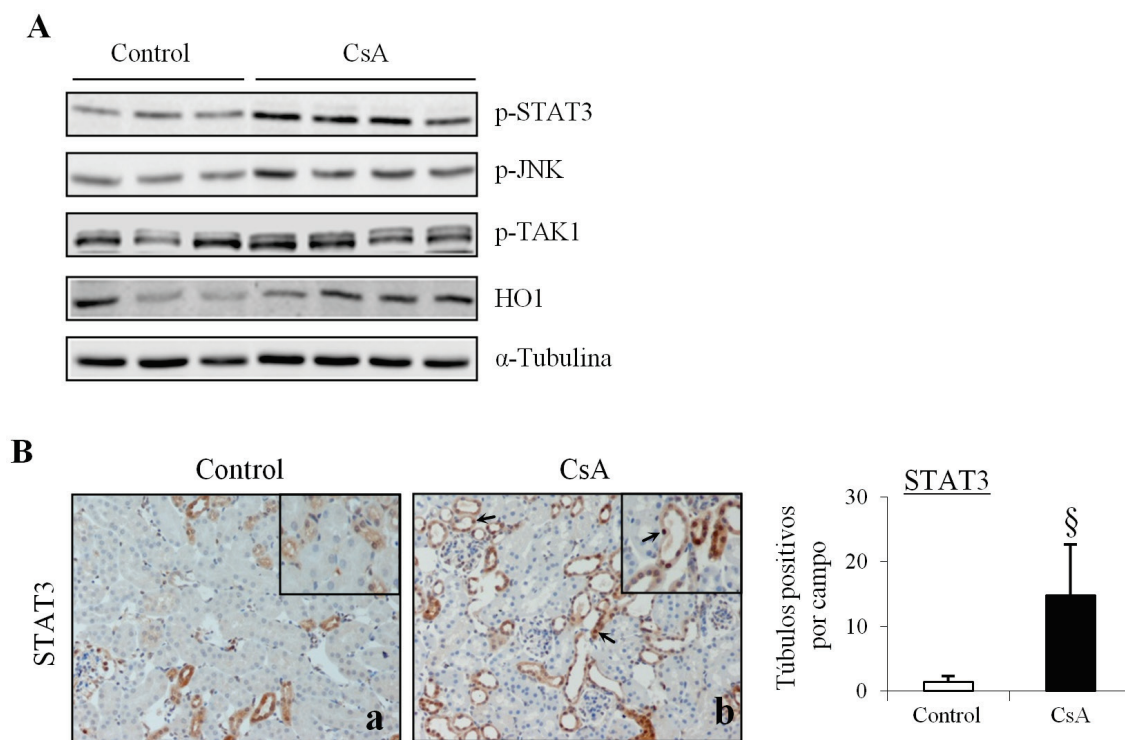
**Figura 39.** A: expresión génica incrementada de mediadores proinflamatorios los animales tratados con CsA del modelo animal medida por RT-qPCR(grupo control n= 8; grupo de CsA n=8. Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al). **B:** Translocación nuclear de NF- $\kappa$ B/p65 en células tubulares (**a** y **b**) e infiltración de monocitos (**c** y **d**) en riñones del modelo experimental de nefrotoxicidad por CsA a 5 días con histogramas con los correspondientes aumentos a la derecha; **a** y **c** corresponden a control, **b** y **d** a tratamiento con CsA (grupo control n= 8; grupo de CsA n=8. Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. Significación: \* indica  $p < 0,05$  respecto al control. Imágenes de microscopía óptica representativas de cada grupo del modelo con magnificación original x200 o x400 en las ampliaciones).



**Figura 40.** Daño renal por CsA en modelo experimental murino de nefrotoxicidad por CsA. Paneles **a** y **b**: tinción tricrómica de Masson. **a** corresponde a control y **b** a tratamiento con CsA (imágenes representativas de microscopía óptica de cada grupo del modelo con magnificación original x200).

#### 4. Resultados

Una vez demostrado que CsA inducía inflamación renal temprana, investigamos si las moléculas y rutas proinflamatorias que se encontraron reguladas positivamente en los cultivos de células tubulares, también exhibían este comportamiento en el tejido renal de los ratones tratados con CsA. Así, la activación *in vivo* de JAK2 fue sugerida por los aumentos de los niveles de fosforilación de STAT3 evaluados por western blot (**fig. 41A**) y por la translocación nuclear de este factor de transcripción detectada por inmunohistoquímica (**fig. 41B**). Además, también por western blot se demostraron aumentos significativos de los niveles de fosforilación de JNK y de TAK1, sugiriendo este último cambio la implicación de rutas de receptores TLR (**fig. 41A**). Por último, también se observaron aumentos de expresión de HO-1, lo que sugería la activación de mecanismos compensatorios antiinflamatorios (**fig. 41A**).

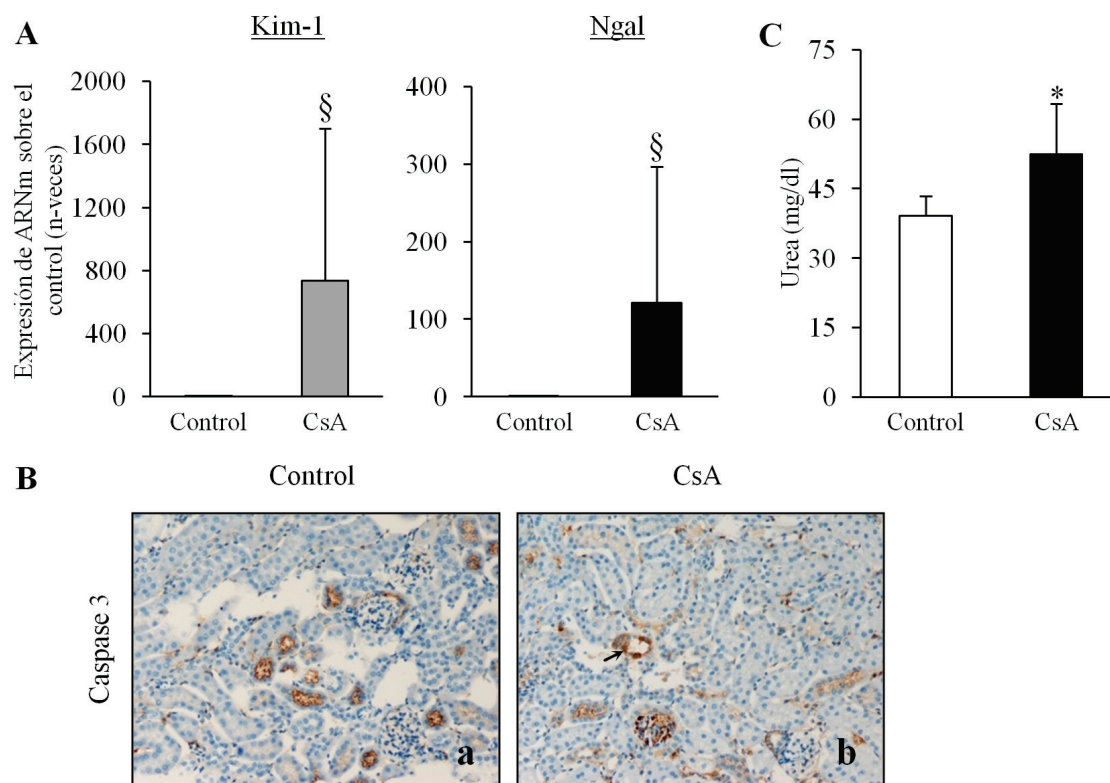


**Figura 41. A:** western blots con los incrementos de diferentes proteínas bajo el tratamiento con CsA. **B:** inmunohistoquímica mostrando el aumento de la internalización de STAT3 en los riñones bajo el tratamiento con CsA y el histograma de cuantificación correspondiente debajo. Las flechas indican zonas de marcaje evidente. (Grupo control  $n=8$ ; grupo de CsA  $n=8$ . Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. Significación: § indica  $p < 0.02$  respecto al control. Imágenes de microscopía óptica representativas con magnificación original x200 o x400 en las ampliaciones).

Por otra parte, se observó una correlación de la inflamación con evidencias de daño y disfunción renal. Así, los ratones a los que se les inyectó CsA mostraron un incremento de la expresión de ARNm de los biomarcadores de daño tubular Kim-1 y Ngal (**fig. 42A**) y daño tisular caracterizado por dilatación y vacuolización tubular, formación de cilindros y presencia de núcleos picnóticos indicando apoptosis (**fig. 42B**). Se evaluó también la apoptosis por medio de una tinción inmunohistoquímica de caspasa-3, que indicó la presencia de algunas



células apoptóticas aisladas. Además, los ratones sometidos al tratamiento con CsA mostraron un aumento moderado, aunque significativo, del nivel de urea en plasma, lo que sugería una disminución de la función renal (**fig. 42C**)



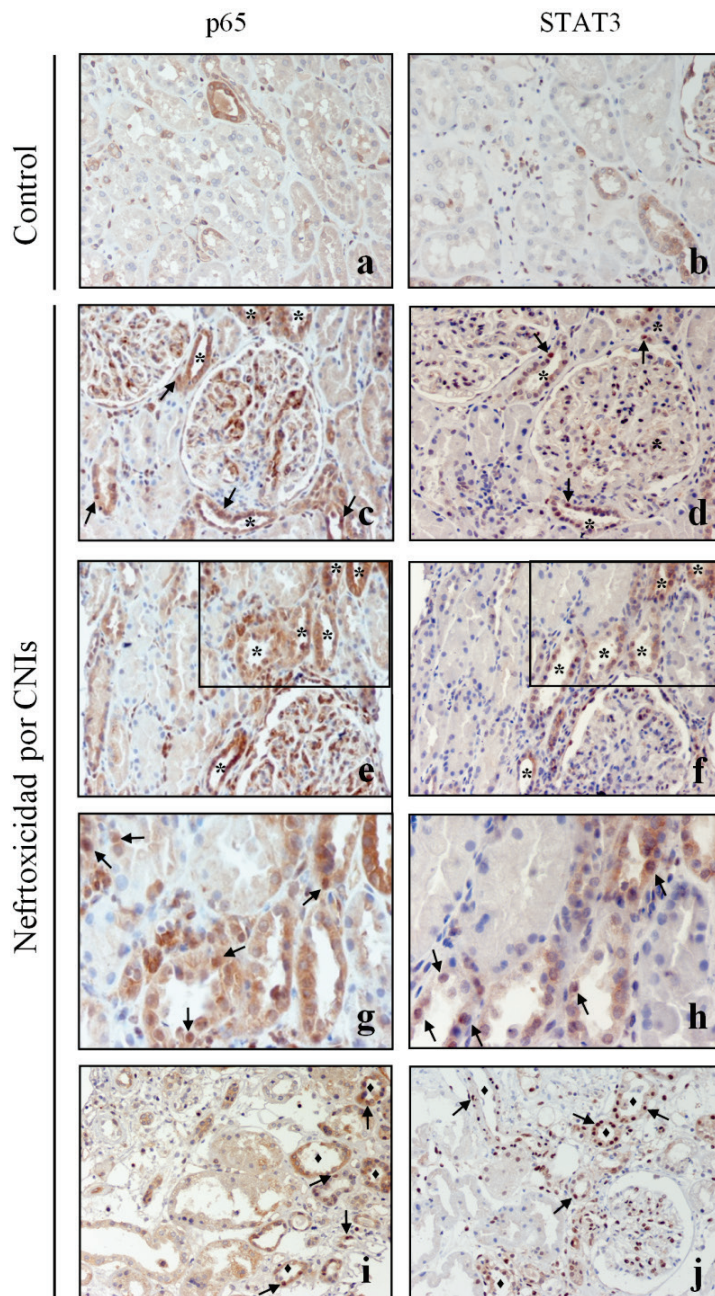
**Figura 42.** **A:** Expresión génica medida por RT-qPCR de los marcadores de daño renal Kim-1 y Ngal en riñones de ratones tratados con CsA durante 5 días (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. Grupo control n= 8; grupo de CsA n=8. Significación: § indica  $p<0,02$  respecto al control). **B:** inmunohistoquímica con anticuerpo contra caspasa 3; **a** indica a una imagen representativa del grupo control del modelo y **b** a una del grupo ciclosporina (Grupo control n= 8; grupo de CsA n=8. Imágenes de microscopía óptica con magnificación original x200 en las ampliaciones). **C:** nivel de urea en plasma del mismo modelo (los datos corresponden a media  $\pm$  desv. est. Grupo control n= 8; grupo de CsA n=8. Significación: \* indica  $p<0,05$  respecto al control).

#### 4.17. Activación de rutas proinflamatorias en biopsias de pacientes con trasplante renal y nefrotoxicidad por inhibidores de calcineurina

En un intento por correlacionar datos de ensayos de cultivos celulares y el modelo murino con efectos potenciales de los CNIs en los riñones humanos, analizamos biopsias obtenidas de pacientes sometidos a un trasplante renal, por medio de las cuales se les diagnosticó toxicidad por CNIs en ausencia de rechazo agudo (**fig. 43**). En estas biopsias, primeramente se analizó la respuesta de NF- $\kappa$ B por ser un factor común de todas las vías proinflamatorias identificadas *in vitro* y confirmadas en el modelo animal. De este modo, por inmunohistoquímica se constató un marcaje nuclear intenso de NF- $\kappa$ B/p65 en células tubulares, poniendo en evidencia su activación. En contraste, en el tejido renal control, se observó una débil expresión citoplásmica de NF- $\kappa$ B/p65 en células tubulares. Además, en

#### 4. Resultados

cortes seriados de estas biopsias también se observó un fuerte aumento en los niveles de expresión y una translocación nuclear evidente de STAT3 en los mismos túbulos y áreas en los que NF- $\kappa$ B se hallaba activado. Esto sugería que rutas de señalización que demostramos que participan en la activación de NF- $\kappa$ B en los modelos celulares y que además se encontraron activadas en el tejido renal de animales tratados con CsA, también podrían ser funcionales en la nefrotoxicidad humana por administración de CNIs.



**Figura 43.** Biopsias de riñones humanos control y con toxicidad por CsA. Inmunohistoquímicas de p65 (a, c, e, g, e i) y STAT3 (b, d, f, h y j) mostrando su aumento en los tratados (c-j) respecto a los controles (a y b). Las flechas negras señalan núcleos con marcaje positivo. Los asteriscos indican marcaje en zonas de cortes sucesivos, mientras que los diamantes señalan positividad en túbulos al azar de las secciones de riñón. Los paneles a-f presentan ampliación a 200 aumentos. Los paneles g-j muestran detalles ampliados a 400 aumentos (Grupo control n= 8; grupo de CsA n=8).

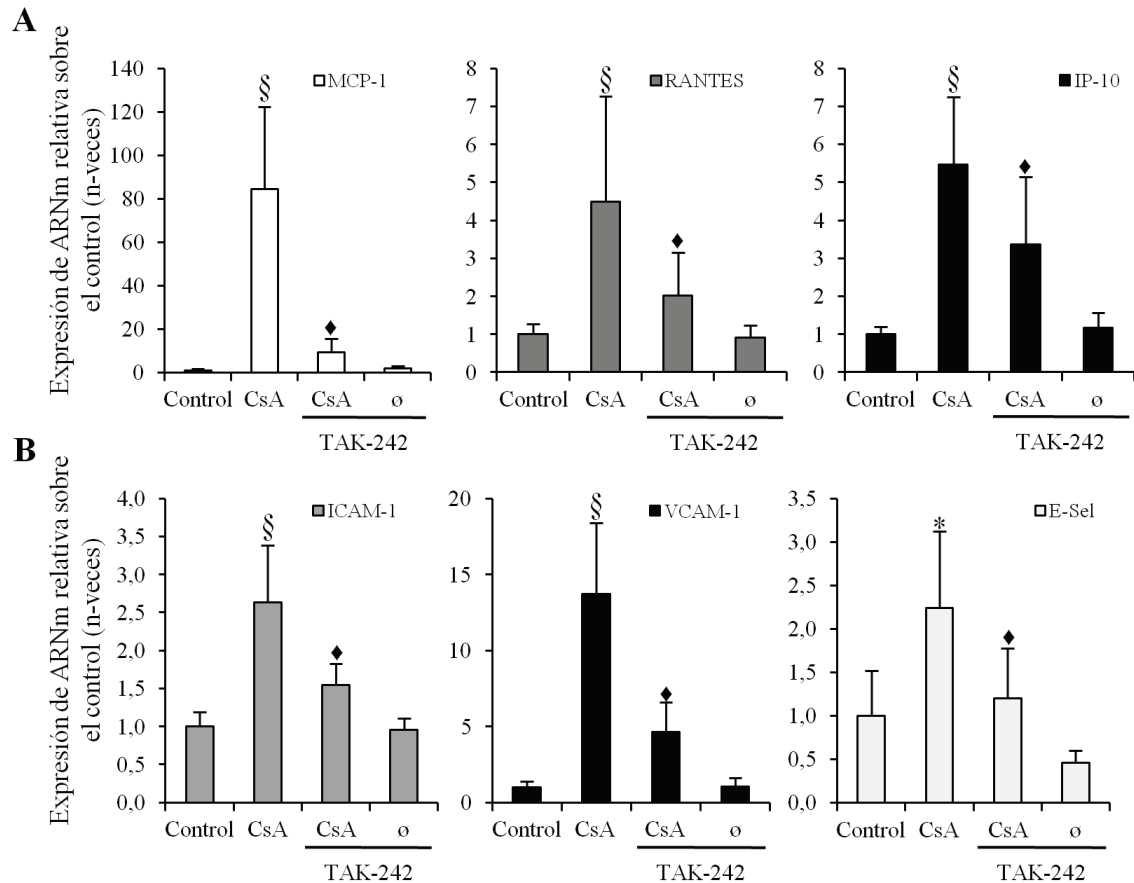


#### **4.18. Intervención terapéutica de la nefrotoxicidad por CsA in vivo. Inhibición de rutas proinflamatorias dependientes de TLR4 con el inhibidor TAK-242**

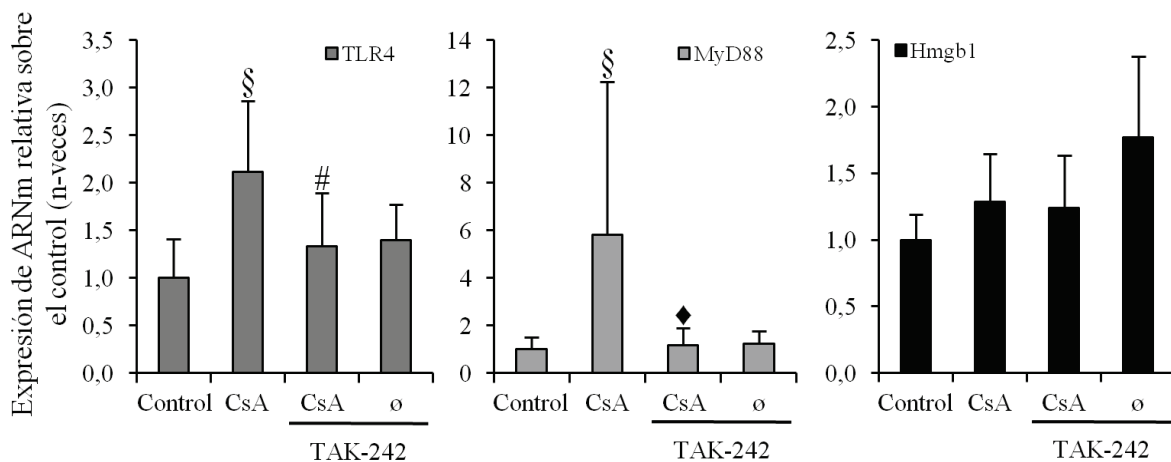
Una vez comprobado en ratones los efectos proinflamatorios renales inducidos por el tratamiento con CsA durante 5 días, sobre la base de este modelo experimental se llevó a cabo una intervención terapéutica con TAK-242, inhibidor farmacológico específico de la activación del receptor TLR4 utilizado también en los ensayos celulares. La elección de este objetivo terapéutico se basó en la evidencia experimental obtenida sobre la participación de este receptor como un activador “upstream” de mediadores moleculares identificados en los experimentos en cultivos de células tubulares y endoteliales y en la posterior identificación de la activación de dianas moleculares de la vía in vivo (modelo animal y biopsias de pacientes), como TAK1 y NF- $\kappa$ B. Además, la inhibición de TLR4 con TAK-242 ha sido empleada por otros investigadores en modelos animales de diversas patologías inflamatorias<sup>239–241</sup>. Para la realización de este modelo se empleó una forma farmacéutica de CsA (Sandimmun), con óptimas propiedades de absorción, que se administró durante 10 días para poder estudiar la progresión del daño. De este modo, se evaluaron parámetros inflamatorios y de activación endotelial, así como el posible daño fibrótico y efectos sobre la vía de señalización de TLR4. En este modelo comprobamos que el cotratamiento con TAK-242, reducía de forma muy significativa la expresión génica de las quimioquinas MCP-1, RANTES e IP-10 inducida por la CsA (**fig. 44A**). De modo similar, la expresión génica de ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina estimulada por CsA también se redujo en animales cotratados con TAK-242, señalando posibles efectos sobre la activación endotelial (**fig. 44B**). Esto indicaba que la actuación farmacológica sobre el TLR4 obstaculizaba dos de los fenómenos iniciales de la nefrotoxicidad por CsA, como son la síntesis de citoquinas proinflamatorias y la activación endotelial. Por otra parte, la expresión de genes en el grupo de animales tratados con TAK-242 (en ausencia de CsA) no mostró diferencias respecto al grupo control.

El análisis de los niveles de ARNm del TLR4 y de MyD88 también arrojó un incremento en los ratones tratados con CsA, reflejando probablemente un recambio proteico por activación de la vía de señalización. En contraposición, los niveles génicos de TLR4 inducidos por CsA, se redujeron significativamente en los ratones tratados con TAK-242, lo que también podría acordar con la inactividad de la vía (**fig. 45**). Analizamos también la expresión de Hmgb1, el principal ligando endógeno del TLR4 implicado en múltiples procesos de inflamación “estéril” mediados por TLR4<sup>242</sup>. Sin embargo, el análisis de sus niveles transcripcionales no evidenció un incremento significativo en la expresión de este gen en el grupo de animales tratados con CsA.

#### 4. Resultados

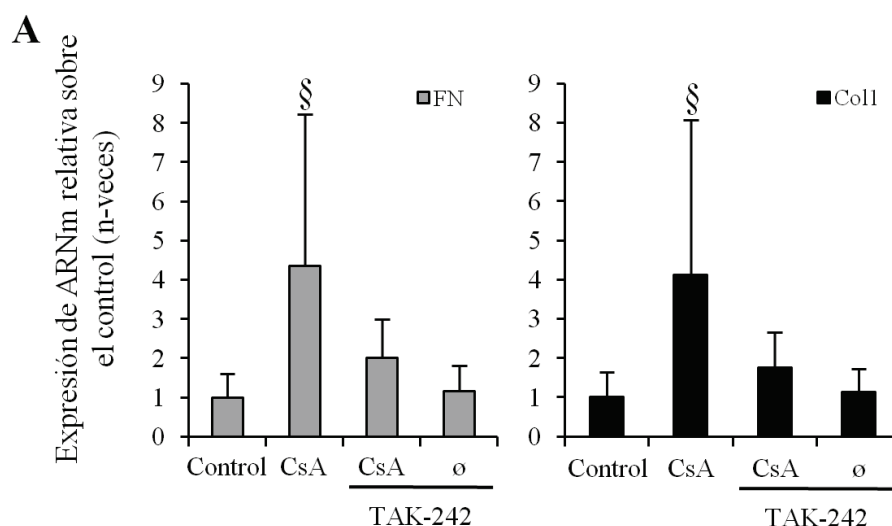


**Figura 44.** Expresión de los genes de mediadores de inflamación MCP-1, RANTES e IP-10(A) y de activación endotelial ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina (E-Sel) (B) medida por RT-qPCR en modelo experimental de nefrotoxicidad por CsA en ratón intervenido farmacológicamente con el inhibidor de TLR4 TAK-242. (Grupo control n= 5; grupo de CsA n=8; grupo de CsA +TAK-242 n=8; y grupo de TAK-242 n=3. Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. \* indica  $p<0,05$  respecto al control, § indica  $p<0,02$  respecto al control; y ♦ indica  $p<0,02$  respecto al estímulo correspondiente).



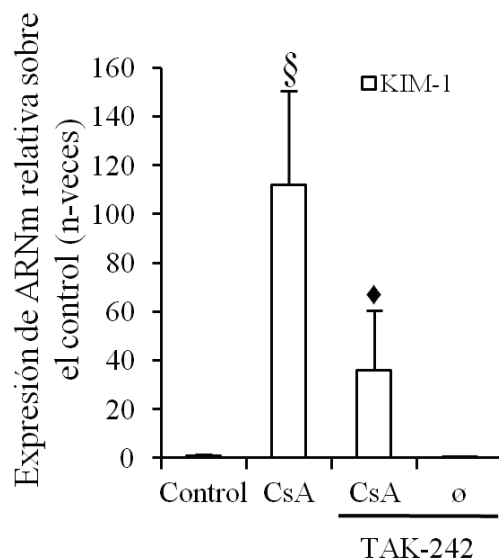
**Figura 45.** Expresión de los genes del receptor TLR4, la proteína de transducción de los TLRs MyD88; y el ligando endógeno de TLR4 Hmgb1 medida por RT-qPCR en modelo experimental de nefrotoxicidad por CsA en ratón intervenido farmacológicamente con el inhibidor de TLR4 TAK-242. (Grupo control n= 5; grupo de CsA n=8; grupo de CsA +TAK-242 n=8; y grupo de TAK-242 n=3. Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. Significación: § indica  $p<0,02$  respecto al control y # indica  $p<0,05$  respecto al estímulo correspondiente).

Por otra parte, el análisis génico de los marcadores profibróticos FN y Col-1, mostró el aumento de la expresión de ambos en los animales tratados con CsA respecto a los controles tratados con vehículo o solo con el inhibidor. Sin embargo, el cotratamiento con CsA y TAK-242 no modificó de forma significativa este comportamiento (**fig 46**). Nuevamente, ni la respuesta génica ni el análisis del tejido renal de la totalidad de los ratones del grupo cotratado con TAK-242 mostró diferencias con respecto a los animales controles.



**Figura 46.** Expresión de los genes profibróticos de fibronectina (FN) y colágeno 1 (Col1) medida por RT-qPCR en modelo experimental de nefrotoxicidad por CsA en ratón intervenido farmacológicamente con el inhibidor de TLR4 TAK-242. (Grupo control n= 5; grupo de CsA n=8; grupo de CsA +TAK-242 n=8; y grupo de TAK-242 n=3. Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control).

Finalmente, como medida del posible efecto protector de la inhibición del receptor TLR4, se evaluaron los niveles de expresión génica de marcador de daño renal Kim1. Este análisis mostró un marcado aumento de la expresión en los animales tratados con CsA, confirmando de este modo resultados previos obtenidos en el modelo de 5 días. Además, los animales cotratados con TAK-242, exhibieron un marcado descenso en la expresión de Kim1 inducida por CsA, puntualizando que la inhibición de la ruta TLR4 no solo puede inhibir los efectos proinflamatorios inducidos por el tratamiento con CsA, sino también prevenir el daño tubular (**fig. 47**).



**Figura 47.** Expresión del gen del marcador de daño renal Kim-1 medida por RT-qPCR en modelo experimental de nefrotoxicidad por CsA en ratón intervenido farmacológicamente con el inhibidor de TLR4 TAK-242. (Grupo control n= 5; grupo de CsA n=8; grupo de CsA +TAK-242 n=8; y grupo de TAK-242 n=3. Los datos corresponden a media  $\pm$ SD. Significación: § indica  $p < 0,02$  respecto al control y ♦ indica  $p < 0,02$  respecto al estímulo correspondiente).

La **parte I** y las secciones **4.16.** y **4.17.** de la **parte III** del capítulo de resultados han sido previamente publicadas en González-Guerrero y Ocaña-Salceda y colaboradores previamente<sup>243</sup>.

## 5. Discusión



En este trabajo de tesis, nuestro principal hallazgo fue demostrar que los CNIs son capaces de iniciar una respuesta inflamatoria temprana en células tubulares renales y células endoteliales microvasculares, así como el tejido renal *in vivo*, a través de múltiples rutas señalización que convergen en la activación de NF- $\kappa$ B y que podrían proporcionar novedosas dianas terapéuticas para el tratamiento de la nefrotoxicidad y para prevenir la progresión del daño renal por estos importantes agente inmunosupresores.

### **5.1. Producción de inflamación y caracterización de mecanismos inflamatorios inducidos por los inhibidores de calcineurina en células tubulares y endoteliales**

La inflamación es una respuesta importante en la progresión del daño renal. Como tal, sus mediadores pueden condicionar la aparición de fenómenos lesivos como la muerte celular, la transición epitelio-mesénquima y, fundamentalmente, la aparición de fibrosis. A pesar de que la inflamación ha sido reconocida como parte de la nefrotoxicidad por CNIs en modelos animales, los mecanismos moleculares que la gobiernan han permanecido mayormente inexplorados. Así, la producción de inflamación y su inhibición en modelos de nefrotoxicidad por CNIs han sido observadas como parte de la caracterización del daño renal en tratamientos contra dianas moleculares no relacionadas con este proceso patológico<sup>223,225</sup>. Esto en parte puede deberse a un papel no predecible como promotores de inflamación, dado que los CNIs son empleados en la práctica clínica como inmunosupresores, cuya acción principal es evitar la activación de la respuesta de linfocitos T a través de la inhibición de la activación de CaN<sup>244</sup>. También se predijo un efecto antiinflamatorio para los CNIs en células tubulares, que produjeron menores niveles de MCP-1 en respuesta a TNF $\alpha$  al pretratar con CsA o Tac<sup>56</sup>. Sin embargo, también se ha descrito un papel de Tac promoviendo la activación y secreción de moléculas inflamatorias en macrófagos, lo que podría tener una incidencia directa en la promoción de la inflamación renal por CNIs<sup>186</sup>.

En este trabajo de tesis, para investigar mecanismos inflamatorios desencadenados por los CNIs en el riñón, inicialmente realizamos ensayos de transcriptómica en células tubulares renales tratadas con los CNIs en ausencia de cualquier otro inductor inflamatorio. Las células tubulares constituyen un eslabón clave de la respuesta inflamatoria renal, ya que ante la agresión o estrés ambiental, son capaces de desencadenar una serie de respuestas adaptativas, entre ellas la secreción de citoquinas proinflamatorias que sirven de nexo entre respuestas de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa<sup>245</sup>. Como primera aproximación al estudio de mecanismos inflamatorios inducidos por los CNIs, se realizó una estimulación directa de células tubulares renales murinas MCT con CsA y Tac, realizándose un posterior análisis de la expresión diferencial de genes mediante transcriptómica.

En trabajos previos de otros investigadores, mediante análisis transcriptómicos se identificaron como elementos principales de la toxicidad de CsA genes relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis y la señalización por TGF $\beta$ <sup>246,247</sup>. A diferencia de estas investigaciones, en nuestros ensayos transcriptómicos logramos la identificación de numerosos factores y rutas de señalización potencialmente implicados en el proceso inflamatorio renal provocado por los CNIs. Así, el análisis del transcriptoma de células tubulares murinas MCTs tratadas con CsA y Tac reveló que la mayor parte de la respuesta fue similar para CsA y Tac, produciéndose pequeñas variaciones entre estímulos para la expresión de genes particulares. Con respecto a genes relacionados con rutas inflamatorias, observamos un incremento de la expresión de subunidades de NF- $\kappa$ B y de genes dependientes y reguladores de este factor de transcripción. También se identificaron genes relacionados con la respuesta mediada por el factor de transcripción AP-1, el cual es un reconocido coactivador de las respuestas proinflamatorias de NF- $\kappa$ B. Entre los genes más regulados, pudimos reconocer varias quimioquinas efectoras de la vía de NF- $\kappa$ B y AP-1, como MCP1 y RANTES, que se utilizaron en posteriores ensayos como las más representativas del proceso inflamatorio desencadenado por los CNIs.

Los resultados de los arrays genómicos se utilizaron como plataforma de estudio para la investigación de moléculas y rutas de señalización proinflamatorias con potencial importancia en la nefrotoxicidad por los CNIs, no solo en células tubulares, sino también en otro tipo celular relevante para la inflamación y el daño renal como es el endotelio.

Las quimioquinas secretadas por las células tubulares están implicadas en la iniciación de la inflamación túbulointersticial a través del reclutamiento de células inmunocompetentes. Entre estas quimioquinas, se ha asociado extensamente a MCP-1 y RANTES con la inducción de lesiones renales y la delección genética o el empleo de antagonistas de estas quimioquinas alivia y reduce el daño renal experimental<sup>74–76,79,82,248</sup>.

La dependencia de la respuesta de quimioquinas con NF- $\kappa$ B fue sugerida por el patrón temporal de transcripción de MCP-1 y RANTES, caracterizada por una rápida inducción y desvanecimiento de la respuesta de MCP1 y una rápida inducción y sostenimiento de la respuesta de Rantes. Esta cinética transcripcional de ambos genes acuerda con pormenorizados estudios *in silico* que clasifican a MCP-1 como un gen de respuesta temprana y a RANTES como de respuesta tardía o de efecto más prolongado<sup>29</sup>. Además, la dependencia de la respuesta de MCP1 y Rantes con la actividad de NF- $\kappa$ B fue puesta de manifiesto por el efecto inhibitorio de partenolide tanto en células tubulares como en endoteliales. Además de la expresión génica de las distintas citoquinas, nuestras observaciones acerca de la rápida fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ , la internalización de NF- $\kappa$ B p65 en , la unión de NF- $\kappa$ B al ADN y la



fosforilación de NF- $\kappa$ B p65 en células epiteliales tubulares, junto a las evidencias obtenidas en las células endoteliales vasculares de fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y de p65 y la internalización de esta última en el núcleo corroboraban que el mecanismo de los CNIs es dependiente de la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B. Estos resultados también demuestran que aunque los CNIs puedan inhibir la activación de NF- $\kappa$ B inducida por citoquinas inflamatorias en células tubulares<sup>56</sup>, también son capaces de desencadenar respuestas proinflamatoria por acción directa sobre el epitelio

Los CNIs también indujeron la activación de STAT3, otro factor de transcripción que regula la inflamación de manera coordinada con NF- $\kappa$ B. y de las proteínas quinasas JAK2 y JNK. Esta activación concurrente de las rutas de señalización de JNK y de JAK2 fue corroborada en las células endoteliales vasculares y concuerda con las evidencias precedentes que las implicaban en inflamación y lesión renal<sup>39,208,234</sup>. JNK y JAK2 también participan en la transición epitelio-mesénquima y en la muerte celular inducida por los CNIs<sup>208,249</sup>, lo que proporciona otro vínculo entre los distintos procesos de la nefrotoxicidad causada por estos compuestos: atrofia tubular, fibrosis intersticial e inflamación.

Entre las proteínas quinasas que estudiamos demostramos también la activación de TAK1, descrito como un importante activador de respuestas dependientes de NF- $\kappa$ B, señalizadas por la activación de JNK durante el progreso del daño renal<sup>233</sup>. De manera importante, demostramos que su inhibición interfiere con la respuesta proinflamatoria de los CNIs en células tubulares en cultivo. Previamente se demostró que CsA produce crecimiento tumoral a través de la vía IRAK/TAK1/NF- $\kappa$ B<sup>250</sup>. TAK1 es activada por rutas dependientes e independientes de TGF  $\beta$  relacionadas con la inmunidad innata y la estimulación de los TLRs<sup>251</sup>. Este hallazgo, además de novedoso, sugería una posible participación de las rutas del sistema inmune innato como participantes en la inflamación inducida por CsA y Tac. Además, la activación de JNK y de la ruta de I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, también son parte de las vías de transducción de señales intrínsecamente ligadas a la activación de receptores TLR. Con respecto a la dependencia de la ruta JAK2/STAT3 con la activación de receptores TLR, ésta es menos conocida, aunque también existen investigaciones que la relacionan como parte integral de la respuesta inflamatoria de los macrófagos frente a la estimulación con ligandos de receptores TLR, principalmente LPS<sup>51</sup>.

De importancia, nuestros resultados no solo demostraron la acción directa de los CNIs sobre el epitelio tubular y el endotelio produciendo respuestas proinflamatorias, sino también la puesta en marcha de mecanismos adaptativos que pueden moderar la inflamación renal. La ausencia de activación de la ruta de señalización Nrf2/HO-1 en ratones Nrf2<sup>-/-</sup> se ha demostrado como un factor importante en el desarrollo del daño renal isquémico y nefrotóxico<sup>163,171,173</sup>. De este modo, nuestros resultados al estimular la ruta de Nrf2/HO-1 con

los CNIs, revelan un potencial papel de esta vía de señalización como limitante de respuestas prooxidativas y proinflamatorias ligadas al estrés, como las que se han verificado para la activación de JAK2, JNK o NF- $\kappa$ B en el riñón<sup>234,252–254</sup>. Relacionado con esto, en nuestros experimentos, el empleo del activador de Nrf2 sulforaphane fue capaz de inhibir la activación de JAK2 y JNK disparadas CsA y Tac en células tubulares. Este resultado podría indicar que la potencial intervención terapéutica de esta ruta con activadores de Nrf2 podría resultar de utilidad en el tratamiento de la nefrotoxicidad por CNIs. En relación, un activador de Nrf2 denominado metil-bardoxolona ha llegado a una experimentación en fase III en ensayos clínicos para la nefropatía diabética, con resultados positivos sobre la mejora de la función renal<sup>169,255,256</sup>. Previamente se describió un papel de la ruta Nrf2/HO-1 estimulada por CsA, con capacidad de inhibir la EMT y la fibrosis en ratones Nrf2<sup>-/-</sup>, lo que de acuerdo a nuestros resultados, podría ser atribuido a la previa inhibición de la inflamación, un aspecto no abordado en este trabajo<sup>170</sup>. Por último, se ha descrito también que Nrf2 es un regulador crítico de la activación de NF- $\kappa$ B mediada por el receptor TLR4 y como tal, un elemento de respuesta frente al involucramiento de respuestas de la inmunidad innata<sup>257</sup>.

Como conclusión, el conjunto de estos resultados, que demostraban la implicación de proteínas quinasas y de la ruta I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B como mediadoras de los efectos proinflamatorios de los CNIs en células tubulares y endoteliales, sugerían que la activación de receptores de la inmunidad innata podría estar jugando un papel como regulador común de todas estas respuestas. Las evidencias precedentes sobre el efecto positivo en el progreso de diversos tipos de lesiones renales en condiciones experimentales mediante la inhibición de las rutas de NF- $\kappa$ B<sup>62,64,67</sup>, JAK/STAT<sup>254,258</sup> y JNK<sup>105,259</sup> ofrece un amplio espectro de posibilidades de intervención terapéutica para prevenir o tratar la nefrotoxicidad inducida por los CNIs. En relación a este tópico, un hecho destacado es la experimentación clínica con inhibidores de algunas de estas rutas. De este modo, se han desarrollado un gran número de inhibidores de bajo peso molecular con potencial terapéutico que interaccionan directamente con NF- $\kappa$ B y JAK/STAT (específicamente con JAK2 y STAT3) o que actúan sobre la activación y rutas de señalización dependientes de estos mediadores, inhibiendo de esta forma el proceso inflamatorio<sup>111,260,261</sup>. Aunque estos fármacos se han ensayado en patologías no relacionadas al riñón, la reutilización de drogas con perfiles farmacocinéticos y de seguridad conocidos, se propone como una estrategia válida para el tratamiento del daño renal.

## 5.2. Inducción de activación endotelial por los inhibidores de calcineurina y caracterización de sus mecanismos en células endoteliales

Además de la contribución de las propias células del parénquima renal, como aquellas del epitelio tubular, se ha comprobado una participación relevante de los endotelios vasculares en los fenómenos patogénicos propios de la enfermedad renal, y de la nefrotoxicidad por CNIs en particular. Los tratamientos con CNIs en pacientes trasplantados se asocian con disfunción endotelial, definido como el desequilibrio entre la producción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, que en el caso de los CNIs resultan en hipertensión<sup>187</sup>. También se conoce que los tratamientos con CNIs producen activación endotelial, un estado del endotelio caracterizado por el aumento de la interacción con células leucocitarias y mayor flujo de las mismas desde los núcleos germinales y la circulación hacia focos inflamatorios locales, como en este caso hacia el riñón<sup>262</sup>. A diferencia de los mecanismos conducentes a la producción de la disfunción endotelial por los CNIs, que han recibido gran atención en la comunidad científica<sup>263</sup>, no existen estudios que demuestren de forma fehaciente que los CNIs inducen activación endotelial.

Los resultados de la presente tesis demostraron una acción directa de los CNIs como inductores de activación endotelial, que caracterizamos a través de la síntesis y secreción de diversas proteínas de adhesión en células endoteliales en cultivo. Estos resultados *in vitro* apoyan evidencias previas de activación endotelial en pacientes sometidos a un trasplante renal y tratados con CsA o Tac, donde se observó un aumento de los niveles plasmáticos de marcadores y células endoteliales<sup>264</sup>. En este estudio se asoció una mayor incidencia de activación endotelial con la acción de Tac. En este sentido, corroboramos un efecto más pronunciado de este fármaco, en comparación con CsA, sobre la respuesta global medida por los niveles transcripcionales y proteicos de los marcadores específicos del proceso (VCAM, ICAM, E-Sel), al igual que sobre el grado de activación de algunos de los mediadores moleculares identificados (I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK).

Con respecto al papel de la activación de NF- $\kappa$ B, en este trabajo hemos establecido un papel limitante de este factor de transcripción sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, que resultó abolida bajo cotratamiento con partenolide. Previamente se estableció un papel de NF- $\kappa$ B como mediador de la activación endotelial por otros inductores de interés en la patología renal, como por ejemplo por toxinas urémicas<sup>59</sup>. A este respecto, nuestros resultados añaden pruebas adicionales del papel de NF- $\kappa$ B como mediador de respuestas endoteliales en procesos patogénicos que afectan al riñón, en este caso específico debido a efectos tóxicos de los CNIs. Por otra parte, la implicación de las quinasas JAK2 y JNK en la activación endotelial inducida por CsA y Tac también quedó demostrada mediante el empleo

de los inhibidores AG490 y SP600125. La implicación de las MAPK promoviendo activación endotelial se observó previamente en la microvasculatura renal de ratones sometidos a isquemia-reperfusión<sup>105</sup>. Además, en un modelo experimental de obstrucción renal, se identificó a STAT3 como uno de los mediadores que promueven la este fenómeno<sup>115</sup>. Los resultados presentados en este trabajo identifican a los CNIs como otros de los estímulos patogénicos activadores del endotelio renal. Además, estos resultados, extienden hallazgos previos sobre la participación de estas quinasas en otros procesos patogénicos que caracterizan la lesión endotelial, como la muerte celular y el daño oxidativo<sup>208</sup>.

Previamente se demostró una acción de CsA incrementando la adhesión de leucocitos a células endoteliales de la microvasculatura de intestino inducida por LPS o TNF $\alpha$  *in vitro*<sup>209</sup>. A diferencia de nuestros resultados, no encontraron evidencias de que la CsA por sí misma aumente la expresión de proteínas de adhesión y los efectos sobre la activación endotelial se atribuyeron al bloqueo de la inducción de iNOS y la producción de óxido nítrico, el cual normalmente limita la ocurrencia de activación. Otra importante diferencia es que en este trabajo las conclusiones se obtuvieron siempre sobre la base de experimentos combinando CsA con LPS o TNF $\alpha$ , mientras que los resultados de la presente tesis demuestran que los CNIs pueden ser verdaderos iniciadores de la lesión endotelial por sí solos.

Por último, las rutas de señalización identificadas en la mediación de los efectos activadores del endotelio por parte de los CNIs, son aquellas que también observamos como implicadas en la síntesis de citoquinas y que postulábamos como probablemente ligadas a la activación de receptores TLR. Al respecto, el ligando específico de TLR4, LPS, es un reconocido activador endotelial<sup>209</sup> y se ha descrito un papel de TLR4 en el daño renal por isquemia<sup>265</sup>.

### **5.3. Participación de receptores de la inmunidad innata como mediadores de la respuesta inflamatoria de los inhibidores de calcineurina en células tubulares y endoteliales**

La inmunidad innata se activa típicamente por la acción de toxinas y material genético de microorganismos, aunque también puede hacerlo en una variedad de condiciones patológicas en ausencia de infección, incluyendo la enfermedad renal aguda y crónica<sup>266,267</sup>. Existen pruebas de que la CsA puede inducir repuestas de la inmunidad innata en riñones de humanos y animales tratados de forma crónica con el fármaco, en los que se detectó un incremento de la expresión de los receptores TLR2 y TLR4, principalmente a nivel tubular<sup>268</sup>. En células tubulares en cultivo se ha comprobado también que CsA puede inducir una expresión retardada de TLR4<sup>222</sup>. Empero, las conclusiones de estos estudios se refieren a

niveles de expresión y no se estudiaron aspectos funcionales, por lo que su abordaje se planteó como objetivo de la presente tesis.

Nuestras sospechas iniciales de la implicación de la activación de receptores TLR surgieron a partir de la observación de que, en células tubulares, tanto CsA como Tac, eran capaces de activar la proteína quinasa TAK1, principalmente implicada en la ruta de señalización de receptores TLR. Una aproximación más concluyente sobre el potencial papel funcional de estos receptores en los efectos proinflamatorios de los CNIs, se dedujo de los experimentos empleando los inhibidores de MyD88 y de IRAK que indicaron la participación de ambas moléculas en los efectos de los CNIs; y a partir de la fosforilación de IRAK1, utilizado como evento reportero de la formación de complejos de señalización proximales de los receptores TLR. MyD88 es una molécula adaptadora clave de la vía de señalización por los TLRs, por lo que su silenciamiento nos proporcionó una idea concreta de la participación de estos receptores en los fenómenos inducidos por los CNIs. En efecto, la reducción de la expresión de MCP-1 y de ICAM-1 mediante el silenciamiento de MyD88 probó el papel clave de los receptores TLR en la inducción de los efectos proinflamatorios desencadenados por los CNIs.

Se sabe que NF- $\kappa$ B<sup>269</sup> y las MAPK<sup>139,270</sup> son mediadores habituales de la señalización por receptores TLR. Nuestros resultados en células endoteliales con MyD88 silenciado mostraron una total inhibición de la activación de JNK y de I $\kappa$ B $\alpha$ , demostrando que efectivamente los estímulos proinflamatorios de los CNIs se canalizaban por ambas vías. Con respecto a la participación de JAK2, investigaciones previas demostraron que esta quinasa puede ser activada por estimulación con LPS en macrófagos<sup>145</sup>. En este sentido, nuestros resultados adquieren importancia al mostrar que la vía de señalización TLR4/JAK2 puede estar activa en células no inmunes, un hecho previamente no reconocido.

Estudios previos han señalado como en el contexto renal, tanto TLR2 como TLR4 son elementos relevantes en la inflamación<sup>9,271</sup> y aún la posible predominancia del TLR2 en la transducción de señales resultantes en inflamación vía NF- $\kappa$ B en procesos inflamatorios crónicos como la nefropatía diabética<sup>269</sup>. Al respecto, el uso del inhibidor CLI-095/TAK-242<sup>272</sup>, que mostró una reducción casi completa de la expresión de las citoquinas proinflamatorias en células epiteliales tubulares, así como de éstas y de las moléculas de adhesión en las células endoteliales, nos sugirió un rol específico del receptor TLR4. En relación, la nula inducción de la síntesis de quimioquinas por los CNIs en células HEK293, naturalmente defectivas para TLR4, apoyaba la participación de este receptor en los efectos proinflamatorios de CsA y Tac. Asimismo, nuestros resultados al tratar las células endoteliales vasculares con LTA, sugieren que el receptor TLR2 no está involucrado en las respuestas inflamatorias de los CNIs y que el disparo de estas ocurre a través de TLR4.

La señalización por TLR4 no solo implica el acoplamiento de MyD88, sino también el acomplejamiento con moléculas accesorias a través del adaptador TRIF. Las respuestas dependientes de TRIF son importantes para sostener en el tiempo los efectos derivados de la estimulación de la vía MyD88 y como vía específica para la síntesis de interferones, una respuesta involucrada activamente en la defensa del organismo frente a virus<sup>146</sup>. De modo importante, sendas investigaciones demuestran que el bloqueo de IRF1<sup>273</sup> y de los receptores de interferones tipo I<sup>274</sup> modera la inflamación y el daño renal por isquemia/reperfusión.

En esta tesis demostramos que CsA y Tac inducen la expresión temprana de genes de la ruta de interferones, como IRF1 e IRF7 y que la inhibición de TRIF con resveratrol repercutió negativamente en la síntesis de citoquinas sintetizadas bajo regulación por MyD88. Además, la expresión de estos genes depende de la fosforilación/activación del factor de transcripción IRF3<sup>149,275</sup>, por lo que la comprobación del aumento de su isoforma fosforilada confirmó de forma inequívoca que los CNIs también activan la respuesta dependiente de TRIF. En definitiva, estos resultados muestran a la ruta de interferones como otro de los potenciales mecanismos que participan en la nefrotoxicidad provocada por los CNIs.

En conjunto, nuestros estudios en cultivos de células epiteliales tubulares y endoteliales microvasculares estimuladas con CNIs revelan múltiples mediadores de la respuesta inflamatoria que confluyen en la activación de NF- $\kappa$ B, y que tanto la respuesta global de citoquinas como la activación de las rutas de señalización pueden ser bloqueadas por la sola inhibición del receptor TLR4.

### **5.4. Producción de ROS e implicación de los mecanismos de activación y supresión de estrés oxidativo sobre la señalización inflamatoria y de activación endotelial en células tubulares y endoteliales**

El estrés oxidativo es una de las principales fuentes de daño en el riñón, ya sea causado por enfermedades como la diabetes<sup>276</sup>, por respuesta a condiciones patológicas como la isquemia-reperfusión, normalmente asociada a trasplantes<sup>277</sup>, o el uso de fármacos, como el cisplatino (Taguchi et al. 2005). En el caso de la CsA, se ha documentado previamente la producción de estrés oxidativo y que ésta puede ocurrir por distintas vías<sup>278</sup>. Nuestros resultados en células endoteliales confirmaron la inducción de ROS por CsA de forma directa mientras que el uso de sulforaphane reveló la efectividad para prevenir los fenómenos proinflamatorios inducidos por los CNIs a través de la ruta de Nrf2, que ya se empleó previamente para aliviar el estrés oxidativo y la inflamación en la enfermedad renal crónica<sup>164</sup> en la que se ha demostrado como una ruta clave<sup>173</sup>.

Múltiples estudios han demostrado que el estrés oxidativo puede inducir distintas rutas de señalización, como NF- $\kappa$ B<sup>64</sup>, JNK<sup>279</sup> o JAK2<sup>208</sup>, cuya inhibición puede prevenir los efectos nocivos de esta fuente de daño. Una de las fuentes clásicas de ROS que desembocan en el estrés oxidativo es la familia de proteínas NADPH-oxidasas. Distintos miembros de esta familia están implicados como mediadores de nefrotoxicidad con CsA<sup>215</sup> y Tac<sup>196</sup>. Nuestros experimentos con los inhibidores de NOX Apocinina y DPI en células endoteliales demostraron una reducción drástica de la expresión génica de MCP-1, Rantes e ICAM-1 y VCAM-1 que señalaría que la participación de esta familia de enzimas productoras de ROS es importante en los procesos de inflamación y activación endotelial disparados por CNIs. En relación, un trabajo reciente de Lee y colaboradores demostró en células mesangiales humanas la activación de NOX por estimulación del TLR4 vía c-Src y con expresión de VCAM-1 dependiente tanto de MyD88 como de NOX<sup>280</sup>.

En consecuencia, nuestros estudios confirman la relevancia del rol de NOX y la producción de estrés oxidativo en la acción de los CNIs. La concurrencia o precedencia respecto a la activación de las vías de señalización que desembocan en inflamación y activación endotelial, sin embargo, todavía ha de ser estudiada.

### **5.5. Papel regulador de calcineurina sobre los efectos inflamatorios inducidos por los inhibidores de calcineurina en células tubulares y endoteliales**

En el sistema inmune, la inhibición de la CaN en los linfocitos T mediante el tratamiento con CNIs bloquea la activación de NF- $\kappa$ B y la inflamación<sup>281</sup>. También se ha reportado que en macrófagos, Tac inhibe la activación y síntesis de citoquinas en respuesta a TNF $\alpha$ . Por contra, en este tipo celular también se ha demostrado que el tratamiento único con Tac, activa la ruta de NF- $\kappa$ B por medio de señalización por TLRs<sup>186</sup>. Por su parte, el papel de la CaN y sus isoformas en los distintos tipos celulares y en la patología renal es complejo y está poco definido con respecto a si su interacción con los CNIs es causa de inflamación y toxicidad renal. En modelos experimentales de nefropatía diabética realizados en ratones con supresión genética de la isoforma  $\beta$  de la subunidad catalítica (CaNA $\beta$ ), su ausencia se asoció con hipertrofia glomerular. El noqueo génico de la isoforma alfa de la subunidad catalítica de calcineurina (CaNA $\alpha$ ) en ratones redundó en la expansión de matriz extracelular y en la aparición de signos de inflamación<sup>204</sup>, aunque estos últimos fueron poco caracterizados. Sin embargo, en estos animales defectivos para CaNA $\alpha$  no se estudiaron las consecuencias del tratamiento con CNIs, lo que podría haber arrojado datos acerca del grado de dependencia de la inflamación y nefrotoxicidad con respecto a la presencia de la fosfatasa. Además, las conclusiones obtenidas mediante esta aproximación experimental podrían verse afectadas por la ausencia de expresión de CaN, que en macrófagos se ha demostrado necesaria para

activar la ruta de TLRs por interacciones con estos receptores<sup>186</sup>. Por último, debido a la falta de viabilidad de los ratones por ausencia de CaN, los riñones se analizaron en ratones de tan solo tres semanas. Este hecho marca una clara diferencia de este modelo con respecto a los tratamientos clínicos con CNIs, que pueden ser causales del rechazo del injerto, pero no afectar la supervivencia de los pacientes.

Nuestros estudios han demostrado que la interacción de los CNIs con la CaN no bastaría por sí sola para inducir inflamación ni activación endotelial. Esto es así debido a que el inhibidor CN585, el cual interacciona con la CaN solapando los sitios de unión de los CNIs<sup>238</sup>, no es capaz por sí mismo de desencadenar ninguna de las respuestas proinflamatorias observadas en células tubulares y endoteliales. Estos resultados podrían indicar que, si la unión a la CaN fuese necesaria para la generación de inflamación por los CNIs, ésta dependería más de las características moleculares de cada inhibidor (estructura, carga, disposición espacial tras de la interacción, etc.), que del sitio de interacción sobre CaN.

Previamente se describió como en macrófagos en reposo la CaN se mantiene unida a receptores TLR, y que la interacción con los CNIs desestabiliza esta unión permitiendo la activación de rutas inflamatorias dependientes de receptores TLR<sup>186</sup>. En este sentido, los resultados presentados en esta tesis muestran que el silenciamiento génico de CaNA $\alpha$  en células endoteliales mediante siRNA tampoco induce por sí mismo la expresión de MCP-1 ni de ICAM-1, probando que en condiciones basales la CaN no es un freno para rutas proinflamatorias y que la hipotética supresión de la actividad de la fosfatasa no desencadena efecto inflamatorio alguno. Por el contrario, en células con CaNA $\alpha$  silenciada, la estimulación con CsA o Tac provocó el incremento de MCP-1 e ICAM-1, aunque por debajo de los niveles alcanzados en las células sin silenciamiento. A diferencia con el silenciamiento de MyD88, que abolía prácticamente de forma completa la respuesta de las células frente a ambos CNIs, el silenciamiento de CaNA $\alpha$  sugería que el mecanismo por el que se inducían los efectos de CsA y Tac no hacía la respuesta nefrotóxica estrictamente dependiente de CaNA $\alpha$ . Por el contrario, estos resultados indicaban que la presencia de CaN podía incrementar la magnitud de las respuestas proinflamatorias inducidas por los CNIs. Como hipótesis explicativa de estos resultados proponemos que los complejos de CsA y Tac con sus correspondientes ciclofilinas intracelulares, podría estabilizar a los CNIs en el interior de la célula, prolongando por lo tanto, su acción tóxica. Alternativamente, la inhibición parcial de la respuesta génica inflamatoria en ausencia de CaN, también podría indicar un papel de la interacción de los CNIs con la fosfatasa sobre los distintos caminos de señalización corriente abajo del TLR4.

El estudio de los efectos de Tac sobre la fosforilación de las proteínas quinasas mediadoras en la respuesta frente a CNIs en células con expresión silenciada de CaNA $\alpha$  nos



reveló que, de las respuestas que dependen de MyD88, solo la activación de JAK2 quedaba abolida, mientras que las vías de p65 y JNK eran insensibles al silenciamiento de CaNA $\alpha$ . Asimismo, en estas células la activación de IRF3 también quedó obstaculizada, probando que la presencia de CaN es necesaria para la activación de la vía de TRIF. Estos resultados plantean que, siendo la de TRIF una vía de sostenimiento de los efectos que se señalizan por MyD88<sup>282</sup>, la interacción de los CNIs con CaN contribuye a acelerar y/o magnificar los efectos inflamatorios de los inhibidores de CaN, probablemente por activar caminos de señalización adaptados por TRIF. Por lo demás, estos resultados muestran que la contribución de la CaN a los efectos tóxicos de los CNIs es específica de proceso, ya que previamente se demostró que esta enzima no participaba en la hialinización arterial en el riñón promovida por Tac<sup>207</sup>.

En conjunto, nuestros resultados señalan que el diferente alcance de la supresión de CaN sobre la activación de las diferentes rutas de señalización disparadas por TLR4, era consistente con la inhibición parcial de la respuesta génica inducida por los CNIs en ausencia de la enzima. En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, indican que los efectos proinflamatorios de los CNIs no dependen de la presencia de CaN para producirse, aunque la enzima parece necesaria para que se induzcan en mayor grado.

### 5.6. Efectos nefrotóxicos *in vivo* de CsA en modelo experimental animal

La identificación de procesos patogénicos involucrados en los efectos tóxicos de los CNIs constituye un reto para la mejora de los tratamientos contra el rechazo del trasplante alogénico. Nuestro objetivo general en esta tesis fue identificar potenciales dianas moleculares y mecanismos bioquímicos de la inflamación renal inducida por los CNIs, reconociendo y postulando que esta respuesta y moléculas específicas de la misma podrían tener un rol fundamental en la progresión de la nefropatía hacia estadios crónicos de la enfermedad.

En los capítulos previos de esta discusión, se expusieron las conclusiones de los resultados de nuestra experimentación en modelos celulares de inflamación renal por los anticalcineurínicos CsA y Tac. Estos resultados resultaron novedosos en demostrar que los CNIs desencadenan una serie de respuestas conservadas, tanto en el epitelio tubular como en células endoteliales, caracterizadas por la activación de respuestas proinflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B, mediadas por la activación de las proteínas quinasas TAK1, JAK2 y JNK. **Resulta extremadamente interesante nuestra demostración de la implicación del receptor TLR4 como denominador común de todas estas respuestas, pues su activación funcional por los CNIs no estaba descrita**<sup>243</sup>. Otro hecho a destacar es que, en los ensayos con células en cultivo, los efectos proinflamatorios de los CNIs se producían en un corto lapso temporal. Para corroborar las acciones proinflamatorias de los CNIs *in vivo*, implementamos

un modelo murino de nefrotoxicidad acelerada por CsA que adaptamos para el estudio de aspectos relacionados a la inflamación. Este modelo se caracteriza por la administración de dosis del fármaco mayores a las habituales y que permiten reproducir la nefrotoxicidad por CNIs en un tiempo menor<sup>208</sup>. Este modelo nos ofrecía ventajas sobre otros habituales en la literatura, basados en la administración diaria de dosis bajas del fármaco durante períodos de al menos 20 días, y que se usan para estudiar aspectos ligados a la nefrotoxicidad crónica de los CNIs<sup>19,220,222,225,230</sup>. De este modo, el modelo escogido nos permitió corroborar que los efectos inflamatorios renales, cuyo rasgo distintivo es la presencia de infiltrado inflamatorio, se desencadenaban de forma temprana, comparados con la aparición de fibrosis. Estas respuestas se caracterizaron por la activación de proteínas quinasas y NF-κB, que corroborándose así los hallazgos en células en cultivo. Igualmente, la detección de algunas de estas señales en biopsias renales provenientes de pacientes trasplantados con nefrotoxicidad por CNIs, nos permitió postular con mayor firmeza la posible relevancia de estos eventos en la patogenia asociada al uso crónico de los CNIs. Asimismo, la identificación de estos mediadores inflamatorios en biopsias diagnósticas de pacientes con trasplante renal, podría ayudar a predecir la evolución del injerto, cuando se descarten otras causas de la nefrotoxicidad.

La caracterización de nuestro modelo de animales tratados durante 5 días, también nos permitió conocer que, mientras que la respuesta inflamatoria se encontró exacerbada, el daño y la apoptosis de las células tubulares era mucho menos evidente. Estos resultados abren la posibilidad de que mecanismos de la inflamación anteriormente no reconocidos, pudieran ser más decisivos sobre la génesis y progresión del daño ocasionado a las células tubulares, en comparación al efecto de los CNIs sobre la viabilidad, un fenómeno central en investigaciones previas con estos inmunosupresores<sup>278,283</sup>. Además, la valoración de la inflamación podría ser más sensible que la medida de parámetros funcionales como los niveles plasmáticos de creatinina y urea, que en nuestro modelo apenas se vieron alterados. Por otra parte, la ausencia de fibrosis en el modelo hiperagudo sugiere que la inflamación precede a la misma, lo que acuerda con estudios sobre la evolución temporal de la nefrotoxicidad inducida por CsA *in vivo*<sup>231</sup>.

Como se discutió más arriba, el hallazgo de que toda la respuesta inflamatoria en células en cultivo sea atribuida a la activación del TLR4 nos motivó a escoger a este receptor como la diana terapéutica más apropiada para ensayar terapias experimentales antiinflamatorias. La participación de TLR4 en la génesis del daño renal de distinto origen<sup>9,106,269</sup>, incluyendo la nefrotoxicidad por CNIs<sup>222</sup>, se describió previamente. Asimismo, la inhibición farmacológica de TLR4 con el fármaco TAK-242, se demostró efectiva en

numerosos modelos animales inflamatorios no renales<sup>240,284,285</sup>. Basándonos en estas investigaciones, utilizamos TAK-242 para estudiar sus efectos sobre la inflamación renal promovida por los CNIs en nuestro modelo de toxicidad acelerada. El aumento de expresión de TLR4 y MyD88 en los ratones tratados con CsA se interpretó como una medida de la actividad de este receptor (lo que implicaría una mayor tasa de recambio de sus componentes) y su inhibición con TAK-242 como una medida de la ocurrencia de inhibición de la ruta. Además, se demostró que TAK-242 fue efectivo para reducir de modo muy significativo la expresión de quimioquinas proinflamatorias y marcadores de activación endotelial, deduciéndose que el bloqueo de TLR4 podría redundar en una menor inflamación.

También confirmamos que el antagonismo farmacológico de TLR4 inhibió la expresión renal de Kim-1 en los animales tratados con TAK-242. El incremento de los niveles urinarios de Kim-1 (que reflejan un aumento de la síntesis renal) es un biomarcador de daño tubular temprano, por lo que la supresión de este aumento indica que el daño tubular es secundario a la activación de TLR4.

En los ratones tratados con CsA también se observó un incremento de la síntesis de ARNm de FN y Col-1 y una tendencia a la inhibición en el grupo tratado con TAK-242. Aunque esta inhibición no alcanzó significación estadística, los resultados podrían indicar que los efectos inhibitorios de TAK-242 sobre la inflamación pudieran incidir sobre la progresión de la fibrosis a tiempos más largos. Por lo tanto, estos resultados abren la perspectiva para estudiar efectos de la inhibición de TLR4 sobre la fibrosis. En este sentido, existen investigaciones previas que relacionan la actividad de este receptor con fibrosis, pero en ellos no se distingue si los efectos son secundarios a la inhibición de la inflamación o afectan directamente a la síntesis de genes profibróticos<sup>267,286</sup>.

Finalmente, indagamos si la activación del TLR4 podría ser inducida por Hmgb1. Este es el principal ligando endógeno implicado en la activación de TLR4 en modelos experimentales de daño renal<sup>121,287</sup>. Sin embargo, en los animales tratados con CsA no observamos modificaciones en sus niveles transcripcionales. Este resultado sugiere que los CNIs pudieran activar al TLR4 por medio de otros ligandos o por mecanismos desconocidos que produzcan la dimerización espontánea del receptor o su interacción con MD2. En relación, la rápida inducción de la síntesis génica de citoquinas inflamatorias en los ensayos en cultivo, abre nuevas perspectivas para el estudio del mecanismo de disparo de las señales inducidas por los CNIs a través de los receptores TLR.

Aparte de aproximaciones experimentales en células en cultivo y modelos animales, la inhibición de TLR4 con TAK-242 también ha sido objeto de ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con sepsis severa. Aunque los resultados no fueron exitosos en esta

## 5. Discusión

---

patología, la inhibición de TLR4 se demostró como una estrategia farmacológica segura (libre de efectos secundarios no deseados)<sup>288,289</sup>. La inhibición terapéutica de la actividad de TLR4 con otros fármacos (Eritoran) también se está estudiando en pacientes con sepsis y en pacientes diabéticos tipo II con resistencia a la insulina<sup>289,290</sup>.

TAK-242 inhibe TLR4 por unirse a la cisteína 747 en el dominio intracelular de TLR4, impidiendo de esta manera el acomplejamiento de MyD88<sup>272</sup>. Eritoran es un antagonista de TLR4 con una estructura similar al LPS y que compite con en su unión al receptor. Aparte de estos fármacos, se han desarrollado otras estrategias para la supresión de la actividad de TLR4 basadas en anticuerpos. Entre ellos, NI-0101 es un anticuerpo monoclonal que impide la dimerización de TLR4 y que se empleó en un ensayo clínico de fase 1 en voluntarios sanos<sup>291</sup>. Otros anticuerpos se han probado con éxito en modelos preclínicos y son potenciales candidatos para su prueba en pacientes<sup>288</sup>.

Estos estudios demuestran que la búsqueda de fármacos con actividad supresora de receptores TLR es un campo activo y que algunos de los compuestos ya desarrollados, u otros que un futuro puedan serlo, podrían ser también de utilidad para el tratamiento de la patología renal por CNIs.

## 6. Conclusiones



## Conclusiones

En modelos celulares y animales de nefrotoxicidad por anticalcineurínicos hemos caracterizado los mecanismos de la inflamación renal en respuesta a los inmunosupresores ciclosporina y tacrolimus. In vivo hemos investigado tratamientos nefroprotectores basados en la inhibición de respuestas de la inmunidad innata. En conclusión, hemos demostrado que:

- 1)** Los inhibidores de calcineurina inducen eventos proinflamatorios en células tubulares y en células endoteliales microvasculares, que incluyen la activación endotelial.
- 2)** La inflamación y la activación endotelial en respuesta a anticalcineurínicos está mediada por múltiples rutas de señalización intracelular, incluyendo las rutas de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ , JAK2/STAT3 y JNK; que se activan en respuesta a la activación del receptor TLR4, y sus complejos proximales adaptados por Myd88 y TRIF.
- 3)** La calcineurina participa en los efectos proinflamatorios y de activación endotelial inducidos por los anticalcineurínicos y su ausencia reduce la intensidad de esos efectos.
- 4)** En un modelo de nefrotoxicidad acelerada *in vivo*, se corroboró que los anticalcineurínicos inducen inflamación renal.
- 5)** El receptor TLR4 es una nueva diana terapéutica en la nefrotoxicidad por anticalcineurínicos ya que el antagonismo farmacológico de TLR4 redujo la inflamación renal y el daño tubulointersticial.





## **7. Bibliografía**



1. Grande MT, L.-N. J. Therapeutical Relevance of MAP-Kinase Inhibitors in Renal Diseases: Current Knowledge and Future Clinical Perspectives | BenthamScience. *Current medicinal chemistry* 2054–2070 (2008). at <<http://www.eurekaselect.com/67390/article>>
2. Butcher, E. C. & Picker, L. J. Lymphocyte Homing and Homeostasis. *Science* (80-. ). **272**, 60–67 (1996).
3. Segerer, S., Nelson, P. J. & Schlöndorff, D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 152–176 (2000).
4. Crockett-Torabi, E. Selectins and mechanisms of signal transduction. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 1–14 (1998).
5. Brady, H. R. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int.* **45**, 1285–1300 (1994).
6. Vaday, G. G. *et al.* Combinatorial signals by inflammatory cytokines and chemokines mediate leukocyte interactions with extracellular matrix. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 885–892 (2001).
7. Campbell, J. J., Foxman, E. F. & Butcher, E. C. Chemoattractant receptor cross talk as a regulatory mechanism in leukocyte adhesion and migration. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2571–8 (1997).
8. Chen, J., Matzuk, M. M., Zhou, X. J. & Lu, C. Y. Endothelial pentraxin 3 contributes to murine ischemic acute kidney injury. *Kidney International* **29**, 997–1003 (2012).
9. Chen, J. *et al.* Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **79**, 288–299 (2011).
10. Sanchez-Nino, M.-D. *et al.* Beyond proteinuria: VDR activation reduces renal inflammation in experimental diabetic nephropathy. *AJP Ren. Physiol.* **302**, F647–F657 (2012).
11. Mannon, R. B. Macrophages: Contributors to Allograft Dysfunction, Repair or Innocent Bystanders? **17**, 20–25 (2012).
12. Okusa, M. D. & Li, L. Dendritic cells in acute kidney injury: cues from the microenvironment. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **123**, 54–62; discussion 62–3 (2012).
13. Heymann, F. *et al.* Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J. Clin. ...* **119**, (2009).

## 7. Bibliografía

---

14. Kim, H. J. *et al.* PNAS Plus: Reverse signaling through the costimulatory ligand CD137L in epithelial cells is essential for natural killer cell-mediated acute tissue inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E13–E22 (2012).
15. Kim, H. J. *et al.* TLR2 Signaling in Tubular Epithelial Cells Regulates NK Cell Recruitment in Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Immunol.* **191**, 2657–64 (2013).
16. Zhang, Z.-X. *et al.* NK cells induce apoptosis in tubular epithelial cells and contribute to renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.* **181**, 7489–7498 (2008).
17. Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. & Mori, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- $\beta$ . *J. Biochem.* **147**, 781–792 (2010).
18. De Albuquerque, D. A. *et al.* An ACE inhibitor reduces Th2 cytokines and TGF-beta1 and TGF-beta2 isoforms in murine lupus nephritis. *Kidney Int.* **65**, 846–859 (2004).
19. Vieira, J. M., Noronha, I. L., Malheiros, D. M. & Burdmann, E. a. Cyclosporine-induced interstitial fibrosis and arteriolar TGF-beta expression with preserved renal blood flow. *Transplantation* **68**, 1746–1753 (1999).
20. Ho, J., Wiebe, C., Gibson, I. W., Rush, D. N. & Nickerson, P. W. Immune monitoring of kidney allografts. *Am. J. Kidney Dis.* **60**, 629–640 (2012).
21. Barnett, N., Dorling, A. & Mamode, N. B cells in renal transplantation: Pathological aspects and therapeutic interventions. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 767–774 (2011).
22. Bagavant, H. & Fu, S. M. Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **21**, 489–494 (2009).
23. Li, L. *et al.* Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J. Clin. Invest.* **119**, 1286–1297 (2009).
24. Bajwa, A., Kinsey, G. R. & Okusa, M. D. Immune Mechanisms and Novel Pharmacological Therapies of Acute Kidney Injury. *Curr. Drug Targets* **10**, 1196–1204 (2009).
25. Pérez de Lema, G. *et al.* Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1369–1382 (2001).
26. Schiffer, L. *et al.* and Disease Remission in Lupus Nephritis 1. *J. Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.180.3.1938
27. Spradley, F. T., De Miguel, C., Hobbs, J., Pollock, D. M. & Pollock, J. S. Mycophenolate mofetil prevents high-fat diet-induced hypertension and renal glomerular injury in Dahl SS rats. *Physiol. Rep.* **1**, e00137 (2013).

28. Condon, M. B. *et al.* Prospective observational single-centre cohort study to evaluate the effectiveness of treating lupus nephritis with rituximab and mycophenolate mofetil but no oral steroids. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1280–6 (2013).
29. Sanz, A. B. *et al.* NF-kappaB in renal inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1254–1262 (2010).
30. Whiteside, S. T. & Israël, A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 75–82 (1997).
31. Henkel, T. *et al.* Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kB subunit. *Cell* **68**, 1121–1133 (1992).
32. Oeckinghaus, a. & Ghosh, S. The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a000034–a000034 (2009).
33. Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Payá, C. V & Moscat, J. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2180–2188 (1999).
34. Lee, J.-I. & Burckart, G. J. Nuclear Factor Kappa B: Important Transcription Factor and Therapeutic Target. *J. Clin. Pharmacol.* **38**, 981–993 (1998).
35. Nakano, H. *et al.* Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3537–3542 (1998).
36. Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G. & Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* **395**, 297–300 (1998).
37. Zandi, E., Chen, Y. & Karin, M. Direct phosphorylation of IkappaB by IKKalpha and IKKbeta: discrimination between free and NF-kappaB-bound substrate. *Science* **281**, 1360–1363 (1998).
38. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M. The I??B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK?? and IKK??, necessary for I??b phosphorylation and NF-??B activation. *Cell* **91**, 243–252 (1997).
39. Ucero, Á. C. *et al.* A Polymeric Nanomedicine Diminishes Inflammatory Events in Renal Tubular Cells. *PLoS One* **8**, (2013).
40. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF-??B Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
41. Neumann, M. *et al.* RelA/p65 is a molecular target for the immunosuppressive action of protein kinase A. *EMBO J.* **14**, 1991–2004 (1995).

42. Naumann, M. & Scheidereit, C. Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *EMBO J.* **13**, 4597–4607 (1994).
43. Coope, H. J. *et al.* CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52. *EMBO J.* **21**, 5375–5385 (2002).
44. Dejardin, E. *et al.* The lymphotoxin- $\alpha$  receptor induces different patterns of gene expression via two NF- $\kappa$ B pathways. *Immunity* **17**, 525–535 (2002).
45. Kayagaki, N. *et al.* BAFF/BLyS receptor 3 binds the B cell survival factor BAFF ligand through a discrete surface loop and promotes processing of NF- $\kappa$ B2. *Immunity* **17**, 515–524 (2002).
46. Saitoh, T. *et al.* TWEAK induces NF- $\kappa$ B2 p100 processing and long lasting NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* **278**, 36005–36012 (2003).
47. Dejardin, E. The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1161–79 (2006).
48. Sakai, N. *et al.* Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14098–14103 (2006).
49. Lee, C. *et al.* TNF  $\alpha$  mediated IL-6 secretion is regulated by JAK/STAT pathway but not by MEK phosphorylation and AKT phosphorylation in U266 multiple myeloma cells. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
50. Grivennikov, S. I. & Karin, M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- $\kappa$ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **21**, 11–19 (2010).
51. Kacimi, R., Giffard, R. G. & Yenari, M. a. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- $\kappa$ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways. *J. Inflamm. (Lond).* **8**, 7 (2011).
52. Chu, W. M. *et al.* JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11**, 721–731 (1999).
53. Cruz, M. *et al.* The contact sensitizer nickel sulphate activates the transcription factor NF-kB and AP-1 and induces the expression of nitric oxide in a skin dendritic cell line. *Exp Dermatol* **13**, 18–26 (2004).
54. Martin, T., Cardarelli, P. M., Parry, G. C., Felts, K. a & Cobb, R. R. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF-kappa B and AP-1. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1091–1097 (1997).

55. Zoja, C., Benigni, A. & Remuzzi, G. The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **29**, 19–24 (2014).
56. Du, S. *et al.* Suppression of NF-kappaB by cyclosporin a and tacrolimus (FK506) via induction of the C/EBP family: implication for unfolded protein response. *J. Immunol.* **182**, 7201–7211 (2009).
57. Li, H.-F., Cheng, C.-F., Liao, W.-J., Lin, H. & Yang, R.-B. ATF3-mediated epigenetic regulation protects against acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1003–1013 (2010).
58. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, (2009).
59. Caballo, C. *et al.* NFkB in the Development of Endothelial Activation and Damage in Uremia: An In Vitro Approach. *PLoS One* **7**, e43374 (2012).
60. Sánchez-López, E. *et al.* CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1513–1526 (2009).
61. Xue, C. *et al.* Powerful protection against renal ischemia reperfusion injury by T cell-specific NF-κB inhibition. *Transplantation* **97**, 391–6 (2014).
62. López-Franco, O. *et al.* Nuclear factor-kappa B inhibitors as potential novel anti-inflammatory agents for the treatment of immune glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* **161**, 1497–1505 (2002).
63. Sanz, A. B. *et al.* Tweak induces proliferation in renal tubular epithelium: A role in uninephrectomy induced renal hyperplasia. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3329–3342 (2009).
64. Francescato, H. D. C., Costa, R. S., Scavone, C. & Coimbra, T. M. Parthenolide reduces cisplatin-induced renal damage. *Toxicology* **230**, 64–75 (2007).
65. Vos, I. H. *et al.* NFkappaB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allografts. *FASEB J.* **14**, 815–822 (2000).
66. Tomita, N. *et al.* In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1244–1252 (2000).
67. Cao, C. C. *et al.* In vivo transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotides attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Kidney Int.* **65**, 834–845 (2004).
68. Rovin, B. H., Doe, N. & Tan, L. C. Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am. J. Kidney Dis.* **27**, 640–646 (1996).

69. Yokoyama, H. *et al.* Urinary levels of chemokines ( MCAF / MCP-1 , IL-8 ) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy Abstract : Leukocytes have been implicated to be involved in the pathogenesis of IgA nephropathy ( IgAN ). To clarify the precise . **63**, 493–499 (1998).
70. Tashiro, K. *et al.* Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* **16**, 1–4 (2002).
71. Rovin, B. H. *et al.* Urine chemokines as biomarkers of human systemic lupus erythematosus activity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 467–473 (2005).
72. El-Shehaby, A. *et al.* Correlations of urinary biomarkers, TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), osteoprotegerin (OPG), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and IL-8 with lupus nephritis. *J. Clin. Immunol.* **31**, 848–56 (2011).
73. Chen, S. *et al.* In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J. Exp. Med.* **188**, 193–198 (1998).
74. Chow, F. Y. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* **69**, 73–80 (2006).
75. Pérez de Lema, G. *et al.* Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 3592–3601 (2005).
76. Xie, C. *et al.* RANTES deficiency attenuates autoantibody-induced glomerulonephritis. *J. Clin. Immunol.* **31**, 128–35 (2011).
77. Wada, T., Yokoyama, H. & Furuichi, K. Intervention of crescentic antibodies to monocyte factor ( MCAF / MCP-1 ) glomerulonephritis by chemotactic and activating. *FASEB J* **10**, 1418–1425 (1996).
78. Lloyd, C. M. *et al.* RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* **185**, 1371–1380 (1997).
79. Kanamori, H. *et al.* Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**, 772–7 (2007).
80. Furuichi, K. *et al.* Chemokine receptor CCR1 regulates inflammatory cell infiltration after renal ischemia-reperfusion injury. *J. Immunol.* **181**, 8670–8676 (2008).
81. Furuichi, K. *et al.* CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 2503–2515 (2003).



82. Kakuta, Y. *et al.* Blocking of CCR5 and CXCR3 suppresses the infiltration of macrophages in acute renal allograft rejection. *Transplantation* **93**, 24–31 (2012).
83. Sullivan, T. J. *et al.* Experimental evidence for the use of CCR2 antagonists in the treatment of type 2 diabetes. *Metabolism*. **62**, 1623–32 (2013).
84. Kang, Y. S. *et al.* CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice. *Kidney Int.* **78**, 883–894 (2010).
85. Paust, H.-J. *et al.* Chemokines play a critical role in the cross-regulation of Th1 and Th17 immune responses in murine crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* **82**, 72–83 (2012).
86. Al-Hamidi, A., Pekalski, M., Robertson, H., Ali, S. & Kirby, J. A. Renal allograft rejection: the contribution of chemokines to the adhesion and retention of alphaE(CD103)beta7 integrin-expressing intratubular T cells. *Mol. Immunol.* **45**, 4000–7 (2008).
87. Roche, J. K., Keepers, T. R., Gross, L. K., Seaner, R. M. & Obrig, T. G. CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 are critical effectors and potential targets for therapy of Escherichia coli O157:H7-associated renal inflammation. *Am. J. Pathol.* **170**, 526–537 (2007).
88. Shimizu, H. *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates renal injury induced by protein-overload proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1496–1505 (2003).
89. Schneider, a *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-beta. *Kidney Int.* **56**, 135–144 (1999).
90. Panzer, U. *et al.* The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* **56**, 2107–2115 (1999).
91. Wenzel, U. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-i mediates monocyte / macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* **51**, 770–776 (1997).
92. Fujinaka, H. *et al.* Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**, 1174–1178 (1997).
93. Tang, W. W., Qi, M. & Warren, J. S. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN. *Kidney Int.* **50**, 665–671 (1996).
94. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37–40 (2001).

95. Cahill, M. a, Janknecht, R. & Nordheim, a. Signalling pathways: jack of all cascades. *Current biology : CB* **6**, 16–19 (1996).
96. Dan, I., Watanabe, N. M. & Kusumi, A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.* **11**, 220–30 (2001).
97. Kolch, W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* **351 Pt 2**, 289–305 (2000).
98. Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P. & van Deventer, S. J. H. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut* **52**, 144–151 (2003).
99. Bogoyevitch, M. a & Kobe, B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 1061–1095 (2006).
100. Liu, J. & Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res.* **15**, 36–42 (2005).
101. Tang, G. *et al.* Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* **414**, 313–7 (2001).
102. Ishikawa, Y. & Kitamura, M. Anti-apoptotic effect of quercetin: Intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int.* **58**, 1078–1087 (2000).
103. Oltmanns, U., Issa, R., Sukkar, M. B., John, M. & Chung, K. F. Role of c-jun N-terminal kinase in the induced release of GM-CSF, RANTES and IL-8 from human airway smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1228–1234 (2003).
104. You, H., Lei, P. & Andreadis, S. T. JNK is a novel regulator of intercellular adhesion. *Tissue barriers* **1**, e26845 (2013).
105. Kanellis, J. *et al.* JNK signalling in human and experimental renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 2898–2908 (2010).
106. Zhang, B., Ramesh, G., Uematsu, S., Akira, S. & Reeves, W. B. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 923–932 (2008).
107. O’Shea, J. J., Holland, S. M. & Staudt, L. M. JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 161–170 (2013).
108. Ihle, J. N., Nosaka, T., Thierfelder, W., Quelle, F. W. & Shimoda, K. Jaks and Stats in cytokine signaling. *Stem Cells* **15 Suppl 1**, 105–111; discussion 112 (1997).
109. Quintás-Cardama, A. & Verstovsek, S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: Mutations, inhibitors, and resistance. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1933–1940 (2013).

110. Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H., Cortes, J. & Verstovsek, S. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 127–140 (2011).
111. Ivanenkov, Y. a, Balakin, K. V & Lavrovsky, Y. Small molecule inhibitors of NF- $\kappa$ B and JAK/STAT signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics. *Mini Rev. Med. Chem.* **11**, 55–78 (2011).
112. Brosius, F. C. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **9**, 245–254 (2008).
113. Marrero, M. B. *et al.* Role of the JAK / STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. 762–768 (2006). doi:10.1152/ajprenal.00181.2005.
114. Mahesh, S. & Kaskel, F. Growth hormone axis in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* **23**, 41–48 (2008).
115. Pang, M. *et al.* A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* **78**, 257–268 (2010).
116. Akira, S. *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
117. Wu, B., Huan, T., Gong, J., Zhou, P. & Bai, Z. Domain combination of the vertebrate-like TLR gene family: Implications for their origin and evolution. *J. Genet.* **90**, 401–408 (2011).
118. Moresco, E. M. Y., LaVine, D. & Beutler, B. Toll-like receptors. *Curr. Biol.* **21**, R488–R493 (2011).
119. Janssens, S. & Beyaert, R. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 637–646 (2003).
120. Rosin, D. L. & Okusa, M. D. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **22**, 416–425 (2011).
121. Wu, H. *et al.* HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1878–1890 (2010).
122. Wu, H. *et al.* TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* **117**, 2847–2859 (2007).
123. Kim, B. S. *et al.* Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* **79**, 1370–7 (2005).
124. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* **13**, 816–825 (2006).

125. Zhang, D. *et al.* A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522–1526 (2004).
126. Farhat, K. *et al.* Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 692–701 (2008).
127. Areal, H., Abrantes, J. & Esteves, P. J. Signatures of positive selection in Toll-like receptor (TLR) genes in mammals. *BMC Evol. Biol.* **11**, 368 (2011).
128. Myneni, S. R. *et al.* Identification of a unique TLR2-interacting peptide motif in a microbial leucine-rich repeat protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 577–582 (2012).
129. Peter, M. E., Kubarenko, A. V, Weber, A. N. R. & Dalpke, A. H. Identification of an N-terminal recognition site in TLR9 that contributes to CpG-DNA-mediated receptor activation. *J. Immunol.* **182**, 7690–7697 (2009).
130. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–5 (2009).
131. Damien, P., Arthaud, C. & Garraud, O. LPS stimulation of purified human platelets is partly dependent on plasma soluble CD14 to secrete their main secreted product , soluble-CD40-Ligand. *BMC Immunol.* **16**, (2015).
132. Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. & Kwiatkowska, K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 557–581 (2014).
133. Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S. & Cao, Z. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* **7**, 837–847 (1997).
134. Janssens, S. & Beyaert, R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol. Cell* **11**, 293–302 (2003).
135. Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J. & Wesche, H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5567–5572 (2002).
136. Cao, Z., Henzel, W. J. & Gao, X. IRAK: A Kinase Associated with the Interleukin-1 Receptor. *Science (80-. )*. **271**, 1128–1131 (1996).
137. Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D. V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* **383**, 443–6 (1996).
138. Muzio, M., Natoli, G., Saccani, S., Levrero, M. & Mantovani, a. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of

- tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J. Exp. Med.* **187**, 2097–2101 (1998).
139. Peroval, M. Y., Boyd, A. C., Young, J. R. & Smith, A. L. A Critical Role for MAPK Signalling Pathways in the Transcriptional Regulation of Toll Like Receptors. *PLoS One* **8**, (2013).
  140. Bhowmick, R., Pore, D. & Chakrabarti, M. K. Outer Membrane Protein A ( OmpA ) of *Shigella flexneri* 2a Induces TLR2-Mediated Activation of B Cells : Involvement of Protein Tyrosine Kinase , ERK and NF- $\kappa$ B. **9**, (2014).
  141. Yee, N. K. & Hamerman, J. A.  $\beta$ 2 integrins inhibit TLR responses by regulating NF- $\kappa$ B pathway and p38 MAPK activation. *Eur. J. Immunol.* **43**, 779–792 (2013).
  142. Hirata, Y., Sugie, A., Matsuda, A., Matsuda, S. & Koyasu, S. TAK1-JNK axis mediates survival signal through Mcl1 stabilization in activated T cells. *J. Immunol.* **190**, 4621–6 (2013).
  143. Sang, H. R., Kim, H., Moyer, M. P. & Pothoulakis, C. Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 18560–18568 (2006).
  144. Santos-Sierra, S. *et al.* Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization. *EMBO J.* **28**, 2018–2027 (2009).
  145. Okugawa, S. *et al.* Janus kinase 2 is involved in lipopolysaccharide-induced activation of macrophages. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **285**, C399–C408 (2003).
  146. Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
  147. Hoebe, K. *et al.* Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* **424**, 743–748 (2003).
  148. Piao, W. *et al.* Recruitment of TLR adapter TRIF to TLR4 signaling complex is mediated by the second helical region of TRIF TIR domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 19036–41 (2013).
  149. Doyle, S. E. *et al.* IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity* **17**, 251–263 (2002).
  150. Kawai, T. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* **167**, 5887–5894 (2001).
  151. Green, N. M., Moodys, K. S., Debatiss, M. & Marshak-Rothsteins, A. Activation of autoreactive B cells by endogenous TLR7 and TLR3 RNA ligands. *J. Biol. Chem.* **287**, 39789–39799 (2012).

152. Hedl, M. & Abraham, C. IRF5 Risk Polymorphisms Contribute to Interindividual Variance in Pattern Recognition Receptor-Mediated Cytokine Secretion in Human Monocyte-Derived Cells. *J. Immunol.* **188**, 5348–5356 (2012).
153. Lin, M. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Promotes Tubular Inflammation in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 86–102 (2012).
154. Brown, H. J. *et al.* Toll-like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody-mediated glomerulonephritis via CXCL1 and CXCL2. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 1732–1739 (2007).
155. Wörnle, M. *et al.* Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.* **168**, 370–385 (2006).
156. Patole, P. S. *et al.* Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1326–1338 (2005).
157. Anders, H.-J. *et al.* Bacterial CpG-DNA aggravates immune complex glomerulonephritis: role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 317–326 (2003).
158. Chen, L. *et al.* TLR signals promote IL-6/IL-17-dependent transplant rejection. *J. Immunol.* **182**, 6217–6225 (2009).
159. Shen, X.-D. *et al.* Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Transplant* **5**, 1793–1800 (2005).
160. Cláudio, N., Dalet, A., Gatti, E. & Pierre, P. Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways. *EMBO J.* **32**, 1214–24 (2013).
161. Wakabayashi, N., Slocum, S. L., Skoko, J. J., Shin, S. & Kensler, T. W. When NRF2 talks, who's listening? *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 1649–1663 (2010).
162. Bellezza, I., Mierla, A. L. & Minelli, A. Nrf2 and NF- $\kappa$ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers (Basel)*. **2**, 483–497 (2010).
163. Shelton, L. M., Park, B. K. & Copple, I. M. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. *Kidney Int.* **84**, 1090–5 (2013).
164. Ruiz, S., Pergola, P. E., Zager, R. a & Vaziri, N. D. Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **83**, 1029–41 (2013).
165. Bouvier, N. *et al.* Cyclosporine triggers endoplasmic reticulum stress in endothelial cells: a role for endothelial phenotypic changes and death. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **296**, F160–F169 (2009).

166. Lin, M. *et al.* Baicalin Ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced Cytotoxicity in HK-2 Cells through the Inhibition of ER Stress and the Activation of Nrf2 Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 12507–12522 (2014).
167. Ryoo, I. G., Ha, H. & Kwak, M. K. Inhibitory role of the KEAP1-NRF2 pathway in TGFβ<sub>1</sub>-stimulated renal epithelial transition to fibroblastic cells: A modulatory effect on SMAD signaling. *PLoS One* **9**, (2014).
168. Shokeir, A. A. *et al.* Activation of Nrf2 by Ischemic Preconditioning and Sulforaphane in Renal Ischemia / Reperfusion Injury : A Comparative Experimental Study By. 1–29
169. Wu, Q. Q. *et al.* Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPARγ, and HO-1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**, F1180–F1192 (2011).
170. Shin, D. H. *et al.* The NRF2-heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 1051–1063 (2010).
171. Jiang, T. *et al.* Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF-κB-mediated inflammatory response. *Kidney Int.* **85**, 333–43 (2014).
172. Li, B. *et al.* Zinc is essential for the transcription function of Nrf2 in human renal tubule cells in vitro and mouse kidney in vivo under the diabetic condition. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 895–906 (2014).
173. Aminzadeh, M. a., Nicholas, S. B., Norris, K. C. & Vaziri, N. D. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **28**, 2038–2045 (2013).
174. Clipstone, N. A. & Crabtree, G. R. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695–7 (1992).
175. Cardenas, M. E., Muir, R. S., Breuder, T. & Heitman, J. Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *EMBO J.* **14**, 2772–2783 (1995).
176. Milan, D., Griffith, J., Su, M., Price, E. R. & McKeon, F. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. *Cell* **79**, 437–447 (1994).
177. Wu, Y. *et al.* FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell* **126**, 375–387 (2006).
178. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J. & Rao, A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205–2232 (2003).

179. Musson, R. E. a & Smit, N. P. M. Regulatory mechanisms of calcineurin phosphatase activity. *Curr. Med. Chem.* **18**, 301–315 (2011).
180. Stie, J. & Fox, D. Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot. Cell* **7**, 177–186 (2008).
181. Aramburu, J., Heitman, J. & Crabtree, G. R. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. *EMBO Rep.* **5**, 343–348 (2004).
182. Satonaka, H. *et al.* Calcineurin Promotes the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Vascular Myocytes and Mediates Vascular Inflammation. *Circ. Res.* **94**, 693–700 (2004).
183. Norris, C. M. *et al.* Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer’s models. *J. Neurosci.* **25**, 4649–4658 (2005).
184. Winslow, M. M., Gallo, E. M., Neilson, J. R. & Crabtree, G. R. The calcineurin phosphatase complex modulates immunogenic B cell responses. *Immunity* **24**, 141–152 (2006).
185. Greenblatt, M. B., Aliprantis, A., Hu, B. & Glimcher, L. H. Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils. *J. Exp. Med.* **207**, 923–931 (2010).
186. Kang, Y. J. *et al.* Calcineurin negatively regulates TLR-mediated activation pathways. *J. Immunol.* **179**, 4598–4607 (2007).
187. Naesens, M., Kuypers, D. R. J. & Sarwal, M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **4**, 481–508 (2009).
188. Myers, B. D. *et al.* The long-term course of cyclosporine-associated chronic nephropathy. *Kidney Int.* **33**, 590–600 (1988).
189. Myers, B. D., Ross, J., Newton, L., Luetscher, J. & Perlroth, M. Cyclosporine-associated chronic nephropathy. *N. Engl. J. Med.* **311**, 699–705 (1984).
190. Ekberg, H. *et al.* Calcineurin inhibitor minimization in the symphony study: Observational results 3 years after transplantation. *Am. J. Transplant.* **9**, 1876–1885 (2009).
191. Ekberg, H. *et al.* Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2562–2575 (2007).
192. Webster, A. C., Woodroffe, R. C., Taylor, R. S., Chapman, J. R. & Craig, J. C. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ* **331**, 810 (2005).



193. Fioretto, P., Najafian, B., Sutherland, D. E. R. & Mauer, M. Tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity in native kidneys of pancreas transplant recipients. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **6**, 101–106 (2011).
194. Goldfarb-Rumyantzev, A. S. *et al.* Role of maintenance immunosuppressive regimen in kidney transplant outcome. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **1**, 563–574 (2006).
195. Pham, P.-T. T., Pham, P.-M. T., Pham, S. V, Pham, P.-A. T. & Pham, P.-C. T. New onset diabetes after transplantation (NODAT): an overview. *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* **4**, 175–186 (2011).
196. Khanna, A., Plummer, M., Bromberek, C., Bresnahan, B. & Hariharan, S. Expression of TGF- $\beta$  and fibrogenic genes in transplant recipients with tacrolimus and cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **62**, 2257–2263 (2002).
197. Artz, M. a. Improved Cardiovascular Risk Profile and Renal Function in Renal Transplant Patients after Randomized Conversion from Cyclosporine to Tacrolimus. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1880–1888 (2003).
198. Mahalati, K., Belitsky, P., Sketris, I., West, K. & Panek, R. Neoral monitoring by simplified sparse sampling area under the concentration-time curve: its relationship to acute rejection and cyclosporine nephrotoxicity early after kidney transplantation. *Transplantation* **68**, 55–62 (1999).
199. Klintmalm, G. B. ., Iwatsuki, S. & Starzl, T. NEPHROTOXICITY OF CYCLOSPORIN A IN LIVER AND KIDNEY TRANSPLANT PATIENTS. *The Lancet* **317**, 470–471 (1981).
200. Jacobson, P. a. *et al.* Genetic and Clinical Determinants of Early, Acute Calcineurin Inhibitor-Related Nephrotoxicity. *Transplantation* **93**, 1 (2012).
201. Azzi, J. R., Sayegh, M. H. & Mallat, S. G. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without ... *J. Immunol.* **191**, 5785–91 (2013).
202. Gooch, J. L. An emerging role for calcineurin A $\alpha$  in the development and function of the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**, F769–F776 (2006).
203. Gooch, J. L., Toro, J. J., Guler, R. L. & Barnes, J. L. Calcineurin A- $\alpha$  But Not A- $\beta$  Is Required for Normal Kidney Development and Function. **165**, 1755–1765 (2004).
204. Gooch, J. L., Roberts, B. R., Cobbs, S. L. & Tumlin, J. A. Loss of the alpha-isoform of calcineurin is sufficient to induce nephrotoxicity and altered expression of transforming growth factor-beta. *Transplantation* **83**, 439–47 (2007).
205. Jennings, C., Kusler, B. & Jones, P. P. Calcineurin inactivation leads to decreased responsiveness to LPS in macrophages and dendritic cells and protects against LPS-induced toxicity in vivo. *Innate Immun.* **15**, 109–120 (2009).

206. Xu, C. *et al.* TNF-mediated damage to glomerular endothelium is an important determinant of acute kidney injury in sepsis. *Kidney Int.* **85**, 72–81 (2014).
207. Chiasson, V. L. *et al.* Endothelial cell transforming growth factor- $\beta$  receptor activation causes tacrolimus-induced renal arteriolar hyalinosis. *Kidney International* **82**, 857–866 (2012).
208. Neria, F. *et al.* Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int.* **75**, 227–234 (2009).
209. Rafiee, P. *et al.* Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS: Paradoxical proinflammatory effect on the microvascular endothelium. *J. Biol. Chem.* **277**, 35605–35615 (2002).
210. Alvarez-Arroyo, M. V. *et al.* Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: Role of vascular endothelial growth factor. *Circ. Res.* **91**, 202–209 (2002).
211. Sereno, J. *et al.* Transition from cyclosporine-induced renal dysfunction to nephrotoxicity in an in vivo rat model. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 8979–8997 (2014).
212. Nielsen, F. T., Jensen, B. L., Hansen, P. B., Marcussen, N. & Bie, P. The mineralocorticoid receptor antagonist eplerenone reduces renal interstitial fibrosis after long-term cyclosporine treatment in rat: antagonizing cyclosporine nephrotoxicity. *BMC Nephrol.* **14**, 42 (2013).
213. Bohra, R. *et al.* Everolimus and Sirolimus in Combination with Cyclosporine Have Different Effects on Renal Metabolism in the Rat. *PLoS One* **7**, (2012).
214. Klawitter, J. *et al.* Low-salt diet and cyclosporine nephrotoxicity: Changes in kidney cell metabolism. *J. Proteome Res.* **11**, 5135–5144 (2012).
215. Djamali, a. *et al.* Nox2 is a mediator of chronic CsA nephrotoxicity. *Am. J. Transplant.* **12**, 1997–2007 (2012).
216. Siedlecki, a. *et al.* RGS4 controls renal blood flow and inhibits cyclosporine-mediated nephrotoxicity. *Am. J. Transplant.* **10**, 231–241 (2010).
217. Klawitter, J. *et al.* Urine metabolites reflect time-dependent effects of cyclosporine and sirolimus on rat kidney function. *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 118–128 (2009).
218. Lloberas, N. *et al.* Different renal toxicity profiles in the association of cyclosporine and tacrolimus with sirolimus in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **23**, 3111–3119 (2008).
219. LaSpina, M. *et al.* An Interleukin-6-Neutralizing Antibody Prevents Cyclosporine-Induced Nephrotoxicity in Mice. *J. Surg. Res.* **148**, 121–125 (2008).

- 
220. Ahn, K. O. *et al.* Influence of angiotensin II on expression of toll-like receptor 2 and maturation of dendritic cells in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation* **83**, 938–947 (2007).
221. Khanna, A. K. & Pieper, G. M. NADPH oxidase subunits (NOX-1, p22phox, Rac-1) and tacrolimus-induced nephrotoxicity in a rat renal transplant model. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22**, 376–385 (2007).
222. Lim, S. W. *et al.* Cyclosporine-induced renal injury induces toll-like receptor and maturation of dendritic cells. *Transplantation* **80**, 691–699 (2005).
223. Li, C. *et al.* Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F46–F57 (2004).
224. Mizui, M. *et al.* Electroporation-mediated HGF gene transfer ameliorated cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **65**, 2041–2053 (2004).
225. Ling, H. *et al.* Therapeutic role of TGF-beta-neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 377–388 (2003).
226. Nielsen, F. T., Ottosen, P., Starklint, H. & Dieperink, H. Kidney function and morphology after short-term combination therapy with cyclosporine A, tacrolimus and sirolimus in the rat. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, 491–496 (2003).
227. Hocherl, K. Cyclosporine A Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression in the Rat Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 2427–2436 (2002).
228. Takeda, Y., Miyamori, I., Furukawa, K., Inaba, S. & Mabuchi, H. Mechanisms of FK 506-induced hypertension in the rat. *Hypertension* **33**, 130–136 (1999).
229. Vaziri, N. D. *et al.* Depressed renal and vascular nitric oxide synthase expression in cyclosporine-induced hypertension. *Kidney Int.* **54**, 482–491 (1998).
230. Andoh, T. F., Burdmann, E. a, Fransechini, N., Houghton, D. C. & Bennett, W. M. Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506. *Kidney Int.* **50**, 1110–1117 (1996).
231. Young, B. a *et al.* Cellular proliferation and macrophage influx precede interstitial fibrosis in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int.* **48**, 439–448 (1995).
232. Berzal, S. *et al.* GSK3, snail, and adhesion molecule regulation by cyclosporine a in renal tubular cells. *Toxicol. Sci.* **127**, 425–437 (2012).
233. Ma, F. Y. *et al.* TGF- $\beta$ 1-activated kinase-1 regulates inflammation and fibrosis in the obstructed kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**, F1410–F1421 (2011).

234. De Borst, M. H. *et al.* c-Jun NH2-terminal kinase is crucially involved in renal tubulo-interstitial inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331**, 896–905 (2009).
235. Ruggiero, V., Loiarro, M. & Sette, C. Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases. *Mediators Inflamm.* **2010**, (2010).
236. Yang, C. W. *et al.* Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* **72**, 1753–9 (2001).
237. Youn, H. S. *et al.* Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR3 and TLR4 by resveratrol: molecular targets are TBK1 and RIP1 in TRIF complex. *J. Immunol.* **175**, 3339–3346 (2005).
238. Erdmann, F. *et al.* The novel calcineurin inhibitor CN585 has potent immunosuppressive properties in stimulated human T cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 1888–1898 (2010).
239. Oya, S. *et al.* Inhibition of Toll-like receptor 4 suppresses liver injury induced by biliary obstruction and subsequent intraportal lipopolysaccharide injection. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **306**, G244–52 (2014).
240. Li, X.-Q. *et al.* Role of the TLR4 pathway in blood-spinal cord barrier dysfunction during the bimodal stage after ischemia/reperfusion injury in rats. *J. Neuroinflammation* **11**, 62 (2014).
241. Takashima, K. *et al.* Analysis of binding site for the novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 1250–1262 (2009).
242. Tsung, A., Tohme, S. & Billiar, T. R. High mobility group box-1 in sterile inflammation. *J. Intern. Med.* **1**, (2014).
243. González-Guerrero, C. *et al.* Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 825–841 (2013).
244. Liu, J. *et al.* Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807–815 (1991).
245. Grande, M. T., Pérez-Barriocanal, F. & López-Novoa, J. M. Role of inflammation in túbulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy. *J. Inflamm. (Lond)*. **7**, 19 (2010).
246. O’Connell, S., Tuite, N., Slattery, C., Ryan, M. P. & McMorrow, T. Cyclosporine A-induced oxidative stress in human renal mesangial cells: A role for ERK 1/2 MAPK signaling. *Toxicol. Sci.* **126**, 101–113 (2012).

- 
247. Jennings, P. *et al.* Inter-laboratory comparison of human renal proximal tubule (HK-2) transcriptome alterations due to Cyclosporine A exposure and medium exhaustion. *Toxicol. In Vitro* **23**, 486–99 (2009).
248. Chow, F. Y. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia* **50**, 471–480 (2007).
249. Pallet, N., Thervet, E. & Anglicheau, D. c-Jun-N-Terminal Kinase Signaling Is Involved in Cyclosporine-Induced Epithelial Phenotypic Changes. *J. Transplant.* **2012**, 1–6 (2012).
250. Xu, J. *et al.* Procarcinogenic effects of cyclosporine A are mediated through the activation of TAK1/TAB1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 363–368 (2011).
251. Sakurai, H. Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**, 522–530 (2012).
252. Bolati, D., Shimizu, H., Yisireyli, M., Nishijima, F. & Niwa, T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- $\kappa$ B. *BMC Nephrol.* **14**, 56 (2013).
253. Shimizu, H., Saito, S., Higashiyama, Y., Nishijima, F. & Niwa, T. CREB, NF- $\kappa$ B, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **304**, C685–92 (2013).
254. Li, R. *et al.* Inhibition of JAK/STAT signaling ameliorates mice experimental nephrotic syndrome. *Am. J. Nephrol.* **27**, 580–589 (2007).
255. Chin, M. *et al.* Mechanisms contributing to adverse cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus and stage 4 chronic kidney disease treated with bardoxolone methyl. *Am. J. Nephrol.* **39**, 499–508 (2014).
256. De Zeeuw, D. *et al.* Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2492–503 (2013).
257. Thimmulappa, R. K. *et al.* Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis.[see comment]. *J. Clin. Invest.* **116**, 984–995 (2006).
258. Ortiz-Muñoz, G. *et al.* Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 763–772 (2010).
259. Flanc, R. S. *et al.* A pathogenic role for JNK signaling in experimental anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* **72**, 698–708 (2007).
260. Ensayo clínico/clinical trial NCT02058017.

261. Ensayo clínico/clinical trial NCT01563302.
262. Rabelink, T. J., de Boer, H. C. & van Zonneveld, A. J. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **6**, 404–414 (2010).
263. Raina, A., Horn, E. T. & Benza, R. L. The Pathophysiology of Endothelin in Complications After Solid Organ Transplantation. *Transplant. J.* **94**, 1 (2012).
264. Al-Massarani, G. *et al.* Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am. J. Transplant.* **8**, 2360–2367 (2008).
265. Chen, J. *et al.* Toll-like receptor 4 regulates early endothelial activation during ischemic acute kidney injury. *Kidney Int.* **79**, 288–299 (2011).
266. Gonçalves, G. M., Castoldi, a., Braga, T. T. & Câmara, N. O. S. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand. J. Immunol.* **73**, 428–435 (2011).
267. Wang, S. *et al.* Recipient Toll-like receptors contribute to chronic graft dysfunction by both MyD88- and TRIF-dependent signaling. *Dis. Model. Mech.* **3**, 92–103 (2010).
268. Lim, B. J., Hong, S. W. & Jeong, H. J. Renal tubular expression of Toll-like receptor 4 in cyclosporine nephrotoxicity. *APMIS* **117**, 583–591 (2009).
269. Mudaliar, H. *et al.* The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **305**, F143–54 (2013).
270. Adhikary, G., Sun, Y. & Pearlman, E. C-Jun NH2 terminal kinase (JNK) is an essential mediator of Toll-like receptor 2-induced corneal inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 991–997 (2008).
271. Correa-Costa, M. *et al.* Pivotal role of toll-like receptors 2 and 4, its adaptor molecule MyD88, and inflammasome complex in experimental tubule-interstitial nephritis. *PLoS One* **6**, (2011).
272. Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T. & Ii, M. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol. Pharmacol.* **79**, 34–41 (2011).
273. Wang, Y. *et al.* IRF-1 promotes inflammation early after ischemic acute kidney injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **20**, 1544–1555 (2009).
274. Freitas, M. C. S. *et al.* Type I interferon pathway mediates renal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* **92**, 131–138 (2011).

- 
275. McCoy, C. E., Carpenter, S., Pålsson-McDermott, E. M., Gearing, L. J. & O'Neill, L. a J. Glucocorticoids inhibit IRF3 phosphorylation in response to toll-like receptor-3 and -4 by targeting TBK1 activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 14277–14285 (2008).
276. Vallon, V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**, R1009–R1022 (2011).
277. Snoeijs, M. G. J. *et al.* Tubular epithelial injury and inflammation after ischemia and reperfusion in human kidney transplantation. *Ann. Surg.* **253**, 598–604 (2011).
278. Xiao, Z. *et al.* Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: A systematic review. *Am. J. Nephrol.* **37**, 30–40 (2013).
279. Arany, I., Megyesi, J. K., Kaneto, H., Tanaka, S. & Safirstein, R. L. Activation of ERK or inhibition of JNK ameliorates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity in mouse renal proximal tubule cells. *Kidney Int.* **65**, 1231–1239 (2004).
280. Lee, I.-T., Shih, R.-H., Lin, C.-C., Chen, J.-T. & Yang, C.-M. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Commun. Signal.* **10**, 33 (2012).
281. Granelli-Piperno, A., Nolan, P., Inaba, K. & Steinman, R. M. The effect of immunosuppressive agents on the induction of nuclear factors that bind to sites on the interleukin 2 promoter. *J. Exp. Med.* **172**, 1869–1872 (1990).
282. Pattison, M. J., MacKenzie, K. F., Elcombe, S. E. & Arthur, J. S. C. IFN- $\gamma$  autocrine feedback is required to sustain TLR induced production of MCP-1 in macrophages. *FEBS Lett.* **587**, 1496–1503 (2013).
283. Justo, P., Lorz, C., Sanz, A., Egido, J. & Ortiz, A. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 3072–3080 (2003).
284. De Seny, D. *et al.* Acute-Phase Serum Amyloid A in Osteoarthritis: Regulatory Mechanism and Proinflammatory Properties. *PLoS One* **8**, (2013).
285. Ni, J. Q. *et al.* Role of toll-like receptor 4 on lupus lung injury and atherosclerosis in LPS-challenge ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, (2013).
286. Pulskens, W. P. *et al.* TLR4 promotes fibrosis but attenuates tubular damage in progressive renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **21**, 1299–1308 (2010).
287. Moreno, J. a. *et al.* HMGB1 expression and secretion are increased via TWEAK-Fn14 interaction in atherosclerotic plaques and cultured monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 612–620 (2013).

## 7. Bibliografía

---

- 288. Savva, A. & Roger, T. Targeting Toll-like receptors: Promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. *Front. Immunol.* **4**, 1–16 (2013).
- 289. Ensayo clínico/clinical trial NCT02267317.
- 290. Ensayo clínico/clinical trial NCT00334828.
- 291. Ensayo clínico/clinical trial NCT01808469.



## **8. Anexo A**



La **parte I** y los apartados **3.16.** y **3.17.** de la **parte III** de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:

González-Guerrero, C. & Ocaña-Salceda C. *et al.* Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 825–841 (2013).

**Artículos originales y revisiones:**

González-Guerrero, C. & Ocaña-Salceda C. *et al.* Calcineurin inhibitors recruit protein kinases JAK2 and JNK, TLR signaling and the UPR to activate NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory responses in kidney tubular cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **272**, 825–841 (2013).

**Trabajos en fase de publicación:**

**Otros trabajos publicados durante el desarrollo de esta tesis:**

Berzal, S. *et al.* TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) regulates junctional proteins in tubular epithelial cells via canonical NF- $\kappa$ B pathway and ERK activation. *J. Cell. Physiol.* **230**, 1580–93 (2015).

Ucero, Á. C. *et al.* A Polymeric Nanomedicine Diminishes Inflammatory Events in Renal Tubular Cells. *PLoS One* **8**, (2013).

**La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la beca concedida al doctorando Carlos Ocaña Salceda por la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.**



## **9. Anexo B**

